

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



P 1623 WD

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
11. Juli 2002 (11.07.2002)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
PCT  
WO 02/053170 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: A61K 38/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/15199

(22) Internationales Anmeldedatum:  
21. Dezember 2001 (21.12.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 00 052.9 2. Januar 2001 (02.01.2001) DE  
101 02 392.8 19. Januar 2001 (19.01.2001) DE  
101 55 093.6 9. November 2001 (09.11.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): INSTITUT FÜR MEDIZINTECHNOLOGIE  
MAGDEBURG GMBH (IMTM) [DE/DE]; Leipziger  
Strasse 44, 39120 Magdeburg (DE).

(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ANSORGE, Siegfried  
[DE/DE]; Am Sportplatz 17, 39291 Hohenwarte (DE).  
LENDECKEL, Uwe [DE/DE]; Institut für Experi-  
mentelle Innere Medizin der Uni, versitätsklinik Magde-  
burg, Leipziger Strasse 44, 39120 Magdeburg (DE).  
NEUBERT, Klaus [DE/DE]; Martin-Luther-Universität  
Biochemie/Biotechnologie, Kurt-Mothes-Strasse 3, 06120

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: COMBINED USE OF ENZYME INHIBITORS AND PHARMACEUTICAL PREPARATIONS THEREOF FOR THE TREATMENT AND PROPHYLAXIS OF ARTERIOSCLEROSIS, FOR THE TREATMENT AND PREVENTION OF ALLERGIC REACTIONS OF TYPE I ACCORDING TO THE GELL AND COOMBS CLASSIFICATION, AND FOR THE TREATMENT AND PREVENTION OF DERMATOLOGICAL DISEASES ASSOCIATED WITH FO

(54) Bezeichnung: KOMBINIERTER VERWENDUNG VON ENZYMINHIBITOREN UND PHARMAZEUTISCHEN ZUBEREITUNGEN DARAUS ZUR THERAPIE UND PROPHYLAXE DER ARTERIOSKLEROSE, ZUR THERAPIE UND PRÄVENTION ALLERGISCHER REAKTIONEN VON TYP I NACH GELL UND COOMBS UND ZUR THERAPIE UND PRÄVENTION DERMATOLOGISCHER ERKRANKUNGEN MIT FOLLIKULÄREN UND EPIDERMALEN HYPERKERATOS

(57) Abstract: The invention relates to the use of inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) and enzymes having the same specific nature of substrate (DP IV enzyme activity), combined with inhibitors of alanyl aminopeptidase (aminopeptidase N, APN), or enzymes having the same specific nature of substrate (APN enzyme activity), for the additive to superadditive inhibition of the activation and proliferation (DNS synthesis) of human T lymphocytes or mononuclear cells and of the production of T<sub>H2</sub> cytokines for the treatment and prevention of allergic reactions of type I according to the Gell and Coombs classification, for the additive to superadditive inhibition of the activation and proliferation (DNS synthesis) of human epidermal and follicular keratinocytes and those of the transitional region between the skin and the mucosa, and for the treatment and prevention of dermatological diseases associated with follicular and epidermal hyperkeratosis and reinforced keratinocyte proliferation. The invention also relates to the use of inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) and enzymes having the same specific nature of substrate (DP IV enzyme activity), combined with inhibitors of alanyl aminopeptidase (aminopeptidase N, APN), or enzymes having the same specific nature of substrate (APN enzyme activity), inhibitors of X-pro-aminopeptidase (aminopeptidase P, APP), inhibitors of the angiotensin-converting enzyme (ACE) and/or of prolyl oligopeptidase (POP, prolylendopeptidase, PEP) for the additive to superadditive inhibition of the activation, DNS synthesis and proliferation of human T lymphocytes or mononuclear cells for the treatment and prophylaxis of arteriosclerosis. The invention further relates to pharmaceutical preparations comprising a plurality of inhibitors of enzymes of the above-mentioned groups.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) sowie von Enzymen mit gleicher Substratspezifität (DP IV-analoge Enzymaktivität) in Kombination mit Inhibitoren der Alanyl-Aminopeptidase (Aminopeptidase N, APN) bzw. Enzymen gleicher Substratspezifität (APN-analoge Enzymaktivität) zur additiven bis superadditiven Hemmung von Aktivierung und Proliferation (DNS-Synthese) humaner T-Lymphozyten bzw. mononukleärer Zellen und Produktion von T<sub>H2</sub>-Zytokinen zur Therapie und Prävention allergischer Reaktionen von Typ I nach Gell und Coombs und zur additiven bis superadditiven Hemmung von Aktivierung, Proliferation (DNS-Synthese) humaner epidermaler und follikulärer Keratinozyten sowie solcher der Übergangszone von Haut zu Schleimhaut sowie zur Therapie und Prävention dermatologischer Erkrankungen mit follikulären und epidermalen Hyperkeratosen und einer verstärkten Keratinozytenproliferation. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) sowie von Enzymen mit gleicher Substratspezifität (DP IV-analoge Enzymaktivität) in Kombination mit Inhibitoren der Alanyl-Aminopeptidase (Aminopeptidase N, APN) bzw. Enzymen gleicher Substratspezifität (DP

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 02/053170 A2



Halle (DE). **REINHOLD, Dirk** [DE/DE]; Institut für Immunologie der Universitätsklinik Magdeburg, Leipziger Strasse 44, 39120 Magdeburg (DE). **VETTER, Robert** [DE/DE]; Universitätsklinik Magdeburg, Leipziger Strasse 44, 39120 Magdeburg (DE). **GOLLNICK, Harald** [DE/DE]; Leipziger Strasse 44, 39120 Magdeburg (DE).

(74) **Anwalt: KOEPE, Gerd, L.**; Koepe & Partner, Postfach 22 12 64, 80502 München (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), curasches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

IV-analoge Enzymaktivität), der X-Pro-Aminopeptidase (Aminopeptidase P, APP), des "angiotensin-converting Enzym" (ACE) und/oder der Prolyl oligopeptidase (POP, Prolylendopeptidase, PEP) zur additiven bis superadditiven Hemmung von Aktivierung, DNS-Synthese und Proliferation humaner T-Lymphozyten bzw. mononukleärer Zellen zur Therapie und Prophylaxe der Arteriosklerose. Die Erfindung betrifft auch pharmazeutische Zubereitungen, die mehrere Inhibitoren von Enzymen der vorgenannten Gruppen umfassen.

**Kombinierte Verwendung von Enzyminhibitoren und pharmazeutischen Zubereitungen daraus zur Therapie und Prophylaxe der Arteriosklerose, zur Therapie und Prävention allergischer Reaktionen vom Typ I nach Gell und Coombs und zur Therapie und Prävention dermatologischer Erkrankungen mit follikulären und epidermalen Hyperkeratosen und einer verstärkten Keratinozytenproliferation**

Die Erfindung betrifft die Hemmung der DNS-Synthese und damit der Proliferation von Immunzellen durch die kombinierte Wirkung von Inhibitoren der Aminopeptidase N (APN, EC3.4.11.2, CD13), der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV, EC 3.4.14.5, CD26), der Prolyloloigopeptidase (POP, Prolylendopeptidase, PEP, EC3.4.21.26), der membranständigen Aminopeptidase P (X-Pro-Aminopeptidase, APP, XPNPEP2, EC 3.4.11.9) und des Angiotensin-konvertierenden Enzyms, (angiotensin-converting enzyme, ACE, EC 3.4.15.1, CD143) bzw. durch die kombinierte Hemmung der Aktivität der genannten Enzyme im Ergebnis der simultanen Applikation von jeweils spezifischen Inhibitoren dieser Enzyme auf der Basis von Aminosäurederivaten, Peptiden oder Peptidderivaten, durch welche die Aktivierung, die DNS-Synthese und damit die Proliferation von Immunzellen supprimiert wird.

Die Erfindung betrifft auch die Hemmung der für die Proliferation notwendigen DNS-Synthese und der Zytokinproduktion (Interleukin-4, IL-4) von  $T_{H2}$ -Zellen durch die kombinierte Wirkung von Inhibitoren der Aminopeptidase N (APN, EC3.4.11.2, CD13), der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV, EC 3.4.14.5, CD26) im Ergebnis der simultanen Applikation von jeweils spezifischen Inhibitoren dieser Enzyme auf der Basis von Aminosäurederivaten, Peptiden oder Peptidderivaten, durch welche die Aktivierung, die Proliferation (DNS-Synthese) und Zytokinproduktion (IL-4) von  $T_{H2}$ -Zellen supprimiert wird.

Die Erfindung betrifft auch die Hemmung der für die Proliferation notwendigen DNS-Synthese von Keratinozyten durch die kombinierte Wirkung von Inhibitoren der Aminopeptidase N (APN, EC3.4.11.2, CD13) und der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV, EC 3.4.14.5, CD26) im Ergebnis der simultanen und zeitlich unmittelbar aufeinanderfolgenden Applikation von jeweils spezifischen Inhibitoren dieser Enzyme oder ähnlich wirkender Enzyme auf der

Basis von Aminosäurederivaten, Peptiden oder Peptidderivaten, durch welche die Proliferation (DNS-Synthese) von Keratinozyten supprimiert wird.

Für alle Erkrankungen mit Autoimmunpathogenese gilt, dass eine Aktivierung und Proliferation von Immunzellen, insbesondere von autoreaktiven T-Zellen, dem Krankheitsprozess zugrunde liegen bzw. diesen ausmachen. Ähnliche Mechanismen kommen bei einer Reihe von entzündlichen Erkrankungen wie der Atherosklerose zur Wirkung, wo T-Lymphozyten eine zentrale Rolle bei Entstehung und Chronifizierung des Krankheitsprozesses spielen.

Es ist gezeigt worden, dass im Prozess der Aktivierung und klonalen Expansion von Immunzellen, insbesondere von T-Lymphozyten, membranständige Peptidasen wie DP IV oder APN eine Schlüsselrolle spielen [Fleischer B: CD26 a surface protease involved in T-cell activation. *Immunology Today* 1994; 15:180-184; Lendeckel U et al.: Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells. *International Journal of Molecular Medicine* 1999; 4:17-27; Riemann D et al.: CD13 - not just a marker in leukemia typing. *Immunology Today* 1999; 20:83-88]. Verschiedene Funktionen mitogen-stimulierter mononukleärer Zellen (MNZ) oder angereicherter T-Lymphozyten wie DNS-Synthese, Produktion und Sekretion von immunstimulierenden Zytokinen (IL-2, IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ ) und Helferfunktionen für B-Zellen (IgG- und IgM-Synthese) können in Gegenwart von spezifischen Inhibitoren der DP IV und der APN gehemmt werden [Schön E et al.: The dipeptidyl peptidase IV, a membrane enzyme involved in the proliferation of T lymphocytes. *Biomed. Biochim. Acta* 1985; 2: K9-K15; Schön E et al.: The role of dipeptidyl peptidase IV in human T lymphocyte activation. *Inhibitors and antibodies against dipeptidyl peptidase IV suppress lymphocyte proliferation and immunoglobulin synthesis in vitro. Eur. J. Immunol.* 1987; 17: 1821-1826; Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor  $\beta$ 1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. *Immunology* 1997; 91: 354-360; Lendeckel U et al.: Induction of the membrane alanyl aminopeptidase gene and surface expression in human T-cells by mitogenic activation. *Biochem. J.* 1996; 319: 817-823; Kähne T et al.: Dipeptidyl peptidase IV: A cell surface peptidase involved in regulating T cell growth (Review). *Int. J. Mol. Med.* 1999; 4: 3-15; Lendeckel U et al.: Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells (Review). *Int. J. Mol. Med.* 1999; 4: 17-27].

Auf der anderen Seite haben wissenschaftliche Erkenntnisse der letzten Jahre die Atherosklerose als eine entzündliche Erkrankung charakterisiert, wobei den T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle für die Entstehung und Entwicklung der Erkrankung zukommt [Ross R: Atherosclerosis- an inflammatory disease. New Engl. J. Med. 1999; 340 (2):115-126]. Demnach werden atherosklerotische Läsionen als eine Serie spezifischer zellulärer und molekularer Reaktionen verstanden, die zusammengenommen eindeutig als Entzündung zu charakterisieren sind. Solche Läsionen, die hauptsächlich in großen und mittleren elastischen und muskulösen Arterien vorkommen, führen zu Ischämie (Durchblutungsstörungen) von Herz, Hirn und Extremitäten bis hin zu Infarkten in den genannten Organen. Atherosklerotische Läsionen bilden sich an definierten arteriellen Orten, wo Abzweigungen und Kurven charakteristische Veränderungen des Blutflusses und der Scherkräfte sowie die Ausbildung von Turbulenzen bewirken [Gotlieb AI et al.: The role of rheology in atherosclerotic coronary artery disease. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. Atherosclerosis and coronary athery disease. Vol. 1 Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996: 595-606]. Gefäßendothel-Zellen bilden dann an diesen Orten spezifische Moleküle, die für die Attraktion, Bindung, Akkumulation sowie Aktivierung von T-Lymphozyten und Monozyten verantwortlich sind. T-Lymphozyten sind wesentliche inflammatorische Zellen in allen Phasen der Atheriogenese. T-Zellen infiltrieren aus dem peripheren Blut in die atherosklerotischen Plaques und vermehren sich am Ort der Läsion [Jonasson L et al.: Regional accumulation of T cells, macrophages and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. Arteriosclerosis. 1986; 6: 131-138; van der Wal AC et al.: Atherosclerotic lesions in humans: in situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. Lab. Invest. 1989; 61: 166-170]. Im Ergebnis dieser Anhäufung aktivierter T-Lymphozyten, die sich durch eine starke Expression der Alanylaminopeptidase und der Dipeptidyl-Peptidase IV auszeichnen, am Ort der atherosklerotischen Läsion werden Chemokine, Zytokine, Wachstumsfaktoren und Proteasen freigesetzt, die zur weiteren Verstärkung des Krankheitsgeschehens führen, indem andere Immunzellen rekrutiert und aktiviert werden [Libby P and Ross R. Cytokines and growth regulatory molecules. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. Atherosclerosis and coronary athery disease. Vol. 1 Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996: 585-594].

Auch Monozyten, die in atherosklerotischen Plaques lokalisiert sind, zeichnen sich durch die konstitutive Expression von z. B. Alanylaminopeptidase (APN) aus und sind, wie unsere Arbeiten zeigen, nachhaltig durch Hemmstoffe der oben beschriebenen Enzyme in ihrem

Wachstum und ihrer Funktion zu supprimieren. Gleiches gilt für Endothelzellen, die ebenfalls diese Ektopeptidasen exprimieren.

Dem Angiotensin-konvertierenden Enzym kommt eine besondere Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose zu: Dieses Enzym bewirkt die Bildung des stark blutdrucksteigernden Angiotensin II (Ang II) aus dem Ang I. Hypertonie ist ein wichtiger Risikofaktor für Atherosklerose und betroffene Patienten haben oft erhöhte Ang II-Spiegel. Daneben ist Ang II proatherogen, indem es das Wachstum von glatten Muskeln (Gefäße) stimuliert [Chobanian AV et al. Renin angiotensin system and atherosclerotic vascular disease. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. Atherosclerosis and coronary artery disease. Vol. 1 Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996: 237-242; Gibbons GH et al. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia: autocrine TGF- $\beta$ 1 expression determines growth response to angiotensin II. J Clin. Invest. 1992; 90: 456-461]. Ang II verstärkt die Entzündungsreaktion darüberhinaus auch über die Erhöhung der Lipoxigenase-Aktivität, wodurch entzündungsfördernde Mediatoren verstärkt freigesetzt werden.

Der Erfindung liegt der überraschende Befund zugrunde, dass die gleichzeitige Wirkung von Inhibitoren der enzymatischen Aktivitäten bzw. die gleichzeitige Beeinflussung der biologischen Aktivitäten von (I) Dipeptidylpeptidase IV und Aminopeptidase N, (II) der Dipeptidylpeptidase IV und des „angiotensin-converting enzyme“, (III) der Dipeptidylpeptidase IV und der Prolyl oligopeptidase sowie (IV) der Dipeptidylpeptidase IV und der X-Pro-Aminopeptidase die DNS-Synthese und damit die Proliferation von mononukleären Zellen (MNZ) als auch von T-Zellen in einem Ausmaß hemmt, das durch die einzelne Applikation dieser Enzyminhibitoren - auch bei höherer Dosierung - nicht erreicht werden kann. Obgleich die genannten Inhibitoren letztendlich den gleichen Prozess, nämlich die DNS-Synthese und damit die Proliferation von Immunzellen, beeinflussen, ist dieser Effekt bei einzelner Applikation der Inhibitoren wesentlich schwächer ausgeprägt und nicht dauerhaft. Wegen der funktionellen Überschneidung der enzymatischen Aktivitäten der genannten Enzyme resultiert, wie unsere Daten zeigen, eine additive bis superadditive Hemmwirkung auf DNS-Synthese und Proliferation aus der gleichzeitigen Hemmung von zwei oder mehreren dieser Enzyme.

Unsere Erfindung zeigt, dass zur Therapie von entzündlichen Erkrankungen wie der Atherosklerose, für deren Entstehung die Proliferation und die Aktivierung von T-Lymphozyten eine

zentrale Rolle Bedeutung hat, die gleichzeitige Applikation von Hemmstoffen der oben genannten Enzyme bzw. entsprechender Zubereitungen und Darreichungsformen daraus geeignet sind.

Im einzelnen liegen der Erfindung die Befunde zugrunde, dass die DNS-Synthese von MNZ und T-Zellen durch die simultane Administration von Inhibitoren der enzymatischen Aktivität von

- I. Dipeptidylpeptidase IV und Aminopeptidase N,
- II. Dipeptidylpeptidase IV und Angiotensin-konvertierendem Enzym,
- III. Dipeptidylpeptidase IV und Prolyloligopeptidase
- IV. Dipeptidylpeptidase IV und X-Pro-Aminopeptidase

in additiver bis superadditiver Weise inhibiert wird.

Die Applikation von Enzyminhibitoren stellt bei den genannten Erkrankungen eine neuartige Methode und ergänzende Therapieform dar.

Die erfindungsgemäß applizierten Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV, der Aminopeptidase N, der Prolyloligopeptidase, des „angiotensin-converting enzyme“ und der X-Pro-Aminopeptidase können in pharmazeutisch anwendbaren Formulierungskomplexen als Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, inhibitorisch wirkende Peptide und Peptidderivate sowie als Antikörper dieses Enzyms zur Anwendung kommen. Bevorzugte Effektoren sind beispielsweise für die DP IV Xaa-Pro-Dipeptide, entsprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylester, Dipeptidboronsäuren (z.B. Pro-boro-Pro) und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)<sub>n</sub>-Peptide (n=0-10), entsprechende Derivate und deren Salze bzw. Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Derivate und deren Salze, wobei Xaa eine  $\alpha$ -Aminosäure/Iminosäure bzw. ein  $\alpha$ -Aminosäurederivat/Iminosäurederivat, vorzugsweise N<sup>e</sup>-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, L-Prolin, L-Tryptophan, L-Isoleucin, L-Valin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z.B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate fungieren. Derartige Verbindungen und deren Herstellung wurden in einem früheren Patent beschrieben (K. Neubert et al. DD296075A5).

Die Inhibitoren werden simultan mit bekannten Trägerstoffen verabreicht. Die Verabreichung erfolgt einerseits als topische Applikation in Form von z.B. Cremes, Salben, Pasten, Gelen, Lösungen, Sprays, Liposomen, Schüttelmixturen, Hydrokolloidverbänden bzw. anderen dermatologischen Grundlagen/Vehikeln einschließlich instilativer Applikation und andererseits als systemische Applikation zur oralen, transdermalen, intravenösen, subcutanen, intracutanen, intramuskulären Anwendung in geeigneten Rezepturen bzw. in geeigneter Galenik.

Für alle allergischen Reaktionen vom Typ I wie Asthma bronchiale oder Heuschnupfen gilt, dass eine Aktivierung, Proliferation und Zytokinproduktion (besonders IL-4) von Immunzellen, insbesondere von T<sub>H2</sub>-Zellen, dem Krankheitsprozess zugrunde liegen [D.D. Corry et al.: Induction and regulation of the IgE response. Nature 1999; 402: B18-B23].

Es ist gezeigt worden, dass im Prozess der Aktivierung und klonalen Expansion von Immunzellen, insbesondere von T-Lymphozyten, membranständige Peptidasen wie DP IV oder APN eine Schlüsselrolle spielen [Fleischer B: CD26 a surface protease involved in T-cell activation. Immunology Today 1994; 15:180-184; Lendeckel U et al.: Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells. International Journal of Molecular Medicine 1999; 4:17-27; Riemann D et al.: CD13 - not just a marker in leukemia typing. Immunology Today 1999; 20:83-88]. Verschiedene Funktionen Mitogen-stimulierter mononukleärer Zellen (MNZ) oder angereicherter T-Lymphozyten wie DNS-Synthese, Produktion und Sekretion von immunstimulierenden Zytokinen (IL-2, IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ ) und Helferfunktionen für B-Zellen (IgG- und IgM-Synthese) können in Gegenwart von spezifischen Inhibitoren der DP IV oder der APN gehemmt werden [Schön E et al.: The dipeptidyl peptidase IV, a membrane enzyme involved in the proliferation of T lymphocytes. Biomed. Biochim. Acta 1985; 2: K9-K15; Schön E et al.: The role of dipeptidyl peptidase IV in human T lymphocyte activation. Inhibitors and antibodies against dipeptidyl peptidase IV suppress lymphocyte proliferation and immunoglobulin synthesis in vitro. Eur. J. Immunol. 1987; 17: 1821-1826; Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor  $\beta$ 1 in PWM-stimulated PBMC and T cells. Immunology 1997; 91: 354-360; Lendeckel U et al.: Induction of the membrane alanyl aminopeptidase gene and surface expression in human T-cells by mitogenic activation. Biochem. J. 1996; 319: 817-823; Kähne T et al.: Dipeptidyl peptidase IV: A cell surface peptidase involved in regulating T cell growth (Review). Int. J.



Mol. Med. 1999; 4: 3-15; Lendeckel U et al.: Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells (Review). Int. J. Mol. Med. 1999; 4: 17-27].

Auf der anderen Seite haben wissenschaftliche Erkenntnisse der letzten Jahre die allergische Reaktion vom Typ I als eine Erkrankung charakterisiert, bei der den  $T_{H2}$ -Lymphozyten eine entscheidende Rolle für die Entstehung und Chronifizierung der Erkrankung zukommt [D.D. Corry et al.: Induction and regulation of the IgE response. Nature 1999; 402: B18-B23. P.J. Barnes: Therapeutic strategies for allergic diseases. Nature 1999; 402: B31-B38].

IL-4 stellt ein Helferzytokin der B-Zell-Proliferation dar, stimuliert die Bildung von IgE und die Expression niedrigaffiner Fc-IgE-Rezeptoren. Darüber hinaus verstärkt IL-4 die Induktion von  $T_{H2}$ -Zellen selbst und kontrolliert die Proliferation und Aktivität von Eosinophilen und Mastzellen. Damit spielt es eine zentrale Rolle bei allergischen Reaktionen vom Typ I [D.P. Stites, A.I. Terr, T.G. Parslow: Medical Immunology. Appelton & Lange, Stamford, CT, 1997].

Der Erfindung liegt ebenfalls der überraschende Befund zugrunde, dass die gleichzeitige Wirkung von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV und der Aminopeptidase N, die Proliferation (DNS-Synthese) und IL-4-Produktion mitogenstimulierter mononukleärer Zellen (MNZ) in einem Ausmaß hemmt, das durch die einzelne Applikation dieser Enzyminhibitoren - auch bei höherer Dosierung - nicht erreicht werden kann. Obgleich die genannten Inhibitoren letztendlich die gleichen Prozesse, nämlich die DNS-Synthese und damit die Proliferation sowie die IL-4-Produktion der  $T_{H2}$ -Zellen, beeinflussen, ist dieser Effekt bei einzelner Applikation der Inhibitoren wesentlich schwächer ausgeprägt und nicht dauerhaft. Wegen der funktionellen Überschneidung der enzymatischen Aktivitäten der genannten Enzyme resultiert, wie unsere Daten zeigen, eine additive bis superadditive Hemmwirkung auf DNS-Synthese und Proliferation aus der gleichzeitigen Hemmung beider Enzyme.

Unsere Erfindung zeigt, dass zur Therapie allergischer Reaktionen vom Typ I für deren Entstehung die Proliferation und die Aktivierung von T-Lymphozyten eine zentrale Bedeutung hat, die gleichzeitige Applikation von Hemmstoffen der DP IV und der APN bzw. entsprechender Zubereitungen und Darreichungsformen daraus geeignet sind.

Im einzelnen liegen der Erfindung die Befunde zugrunde, dass die DNS-Synthese und die IL-4-Produktion von MNZ durch die simultane Administration von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV und Aminopeptidase N in additiver bis superadditiver Weise inhibiert wird.

Die Applikation von Enzyminhibitoren stellt bei den genannten Erkrankungen eine neuartige Methode und ergänzende Therapieform dar.

Die erfindungsgemäß applizierten Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV und der Aminopeptidase N können in pharmazeutisch anwendbaren Formulierungskomplexen als Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, inhibitorisch wirkende Peptide und Peptidderivate sowie als Antikörper dieses Enzyms zur Anwendung kommen. Bevorzugte Effektoren sind beispielsweise für die DP IV Xaa-Pro-Dipeptide, entsprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylester, Dipeptidboronsäuren (z.B. Pro-boro-Pro) und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)<sub>n</sub>-Peptide (n=0-10), entsprechende Derivate und deren Salze bzw. Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Derivate und deren Salze, wobei Xaa eine  $\alpha$ -Aminosäure/Iminosäure bzw. ein  $\alpha$ -Aminosäurederivat/Iminosäurederivat, vorzugsweise N<sup>ε</sup>-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, L-Prolin, L-Tryptophan, L-Isoleucin, L-Valin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z.B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate fungieren. Derartige Verbindungen und deren Herstellung wurden in einem früheren Patent beschrieben (K. Neubert et al. DD296075A5).

Bevorzugte Inhibitoren für die Alanyl-Aminopeptidase sind Bestatin (Ubenimex), Actinonin, Probestin, Phebestin, RB3014 oder Leuhistin.

Die Inhibitoren werden simultan mit bekannten Trägerstoffen verabreicht. Die Verabreichung erfolgt einerseits als topische Applikation in Form von z.B. Cremes, Salben, Pasten, Gelen, Lösungen, Sprays, Liposomen, Schüttelmixturen, Hydrokolloidverbänden bzw. anderen dermatologischen Grundlagen/Vehikeln einschließlich instilativer Applikation und andererseits als systemische Applikation zur oralen, transdermalen, intravenösen, subcutanen, intracutanen, intramuskulären Anwendung in geeigneten Rezepturen bzw. in geeigneter Galenik.

Eine Reihe dermatologischer Erkrankungen gehen mit follikulären und epidermalen Hyperkeratosen und einer verstärkten Keratinozytenproliferation einher. Zu ihnen gehören sowohl

entzündliche und nicht entzündliche epidermale Hyperproliferations-Zustände (z. B. congenitale Ichthyosen und Psoriasis), benigne und maligne umschriebene epidermale clonale Expansionen (z. B. Warzen, Condylome, aktinische Keratosen/Präcancerosen), benigne und maligne follikuläre Hyperproliferations-Zustände (z. B. Keratosis follicularis) als auch benigne und maligne epitheliale Adnextumoren und primäre und reaktive Nagelzellhyperproliferationen. Eine Detailinformation dazu ist in Tabelle 1 beigelegt.

Peptidasen wie die Dipeptidylpeptidase IV und die Aminopeptidase N oder ähnlich wirkende Enzyme sind für die Regulation bzw. Modulation von Wechselwirkungen zwischen Zellen besonders interessant, da sie u. a. als Ektoenzyme in der Plasmamembran der Zellen lokalisiert sind, Interaktionen mit anderen extrazellulären Strukturen eingehen, peptiderge Botenstoffe durch enzymkatalysierte Hydrolyse aktivieren bzw. inaktivieren und dadurch wichtig für die Zell-Zell-Kommunikation sind [Yaron A, et al.: Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. Crit Rev Biochem Mol Biol 1993;28:31-81; Vanhoof G, et al.: Proline motifs in peptides and their biological processing. FASEB J 1995;9:736-744].

Es ist gezeigt worden, dass im Prozess der Aktivierung und klonalen Expansion von Immunzellen, insbesondere von T-Lymphozyten, membranständige Peptidasen wie DP IV oder APN eine Schlüsselrolle spielen [Fleischer B: CD26 a surface protease involved in T-cell activation. Immunology Today 1994; 15:180-184; Lendeckel U et al.: Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells. International Journal of Molecular Medicine 1999; 4:17-27; Riemann D et al.: CD13 - not just a marker in leukemia typing. Immunology Today 1999; 20:83-88]. Verschiedene Funktionen Mitogen-stimulierter mononukleärer Zellen (MNZ) oder angereicherter T-Lymphozyten wie DNS-Synthese, Produktion und Sekretion von immunstimulierenden Zytokinen (IL-2, IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ ) und Helferfunktionen für B-Zellen (IgG- und IgM-Synthese) können in Gegenwart von spezifischen Inhibitoren der DP IV oder der APN gehemmt werden [Schön E et al.: The dipeptidyl peptidase IV, a membrane enzyme involved in the proliferation of T lymphocytes. Biomed. Biochim. Acta 1985; 2: K9-K15; Schön E et al.: The role of dipeptidyl peptidase IV in human T lymphocyte activation. Inhibitors and antibodies against dipeptidyl peptidase IV suppress lymphocyte proliferation and immunoglobulin synthesis in vitro. Eur. J. Immunol. 1987; 17: 1821-1826; Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor  $\beta$ 1 in

PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354-360; Lendeckel U et al. : Induction of the membrane alanyl aminopeptidase gene and surface expression in human T-cells by mitogenic activation. Biochem. J. 1996; 319: 817-823; Kähne T et al.: Dipeptidyl peptidase IV: A cell surface peptidase involved in regulating T cell growth (Review). Int. J. Mol. Med. 1999; 4: 3-15; Lendeckel U et al.: Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells (Review). Int. J. Mol. Med. 1999; 4: 17-27]. Es ist bereits bekannt, daß die Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Transplantatabstoßung durch Hemmung der auf Immunzellen lokalisierten Dipeptidylpeptidase IV mit Hilfe von synthetischen Inhibitoren möglich ist (z. B. EP764151 A1, WO09529691, EP731789 A1, EP528858).

Der Erfindung liegt der überraschende Befund zugrunde, dass die gleichzeitige Wirkung von Inhibitoren der auf bzw. in Keratinozyten exprimierten Dipeptidyl-peptidase IV/CD26 und Aminopeptidase N/CD13 oder ähnlicher Enzyme, die Proliferation (DNS-Synthese) dieser Zellen in einem Ausmaß hemmt, das durch die einzelne Applikation dieser Enzyminhibitoren bei der gegebenen Dosierung nicht erreicht werden kann. Obgleich die genannten Inhibitoren letztendlich die gleichen Prozesse, nämlich die DNS-Synthese und damit die Proliferation der Keratinozyten, beeinflussen, ist dieser Effekt bei einzelner Applikation der Inhibitoren schwächer ausgeprägt und nicht dauerhaft. Wegen der funktionellen Überschneidung der enzymatischen Aktivitäten der genannten Enzyme resultiert, wie unsere Daten zeigen, eine additive und bei niedrigeren Konzentrationen eine additive bis superadditive Hemmwirkung auf DNS-Synthese und Proliferation aus der gleichzeitigen Hemmung beider Enzyme.

Unsere Erfindung zeigt, dass zur Therapie und zur Prävention von sowohl entzündlichen und nicht entzündlichen epidermalen Hyperproliferationszuständen (z. B. congenitale Ichthyosen und Psoriasis), benignen und malignen umschriebenen epidermalen clonalen Expansionen (z. B. Warzen, Condylome, aktinische Keratosen/ Präcancerosen), benignen und malignen follikulären Hyperproliferationszuständen (z. B. Keratosis follicularis) als auch benignen und malignen epithelialen Adnextumoren und primären und reaktiven Nagelzellhyperproliferationen für deren Entstehung die Proliferation und die Aktivierung von epidermalen und follikulären Keratinozyten sowie von Keratinozyten der Übergangsschleimhautzone eine zentrale Bedeutung hat, die gleichzeitige Applikation von Hemmstoffen der DP IV und der APN oder ähnlicher Enzyme bzw. entsprechender Zubereitungen und Darreichungsformen daraus geeignet sind.

Neben Keratinozyten spielen auch T-Lymphozyten bei entzündlichen Erkrankungen der Haut, insbesondere bei Autoimmunerkrankungen wie der Psoriasis, eine zentrale Rolle. T-Zellen exprimieren wie Keratinozyten die hier behandelten Peptidasen DP IV und APN. Daraus folgt, dass der therapeutische Effekt, der hier für den Zelltyp Keratinozyten beansprucht bzw. geschützt wird, durch die Beeinflussung der T-Zellen weiter verstärkt wird (siehe Patentanmeldung AZ 10025464.0; Kombinierte Verwendung von Enzyminhibitoren und pharmazeutischen Zubereitungen daraus zur Therapie von Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis, Lupus erythematoses, Multiple Sklerose, Insulin-abhängiger Diabetes mellitus (IDDM), Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa, Psoriasis, Neurodermitis, Glomerulonephritis, interstitielle Nephritis, Vaskulitis, autoimmune Schilddrüsenerkrankungen oder autoimmun-hämolytische Anämie, sowie bei Transplantation und Tumorerkrankungen).

Im einzelnen liegen der Erfindung die Befunde zugrunde, dass die DNS-Synthese von HaCaT-Keratinozyten durch die simultane Administration von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV und der Aminopeptidase N in additiver und bei kleineren Konzentrationen in superadditiver Weise inhibiert wird.

Die oben genannten Erkrankungen werden bisher topisch mit antiproliferativen und differenzierenden Substanzen (Salizylsäure, Harnstoff, endogene und synthetische Retinoide, Vitamin D3-Derivate, Kortikosteroide) sowie systemisch mit z. T. immunsuppressiven und antiproliferativen Präparaten (z. B. Cyclosporin A, Kortikosteroide, Retinoide) behandelt. Insbesondere bei der systemischen Anwendung treten häufig unerwünschte Nebenwirkungen auf. Der kombinierte Einsatz von DP IV- und APN-Inhibitoren würde bei den genannten Erkrankungen eine neuartige, vorraussichtlich sehr effektive, möglicherweise kostengünstige Therapieform und einen wertvollen alternativen Bestandteil der bestehenden Therapiekonzepte darstellen.

Die erfindungsgemäß applizierten Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV und der Aminopeptidase N oder ähnlicher Enzyme können in pharmazeutisch anwendbaren Formulierungskomplexen als Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, inhibitorisch wirkende Peptide und Peptid-derivate sowie als Antikörper dieser Enzyme zur Anwendung kommen. Bevorzugte Inhibitoren sind beispielsweise für die DP IV Xaa-Pro-Dipeptide, entsprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylester, Dipeptidboronsäuren (z. B. Pro-boro-Pro) und deren

Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)<sub>n</sub>-Peptide (n=0 bis 10), entsprechende Derivate und deren Salze bzw. Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Derivate und deren Salze, wobei Xaa eine  $\alpha$ -Aminosäure/Iminosäure bzw. ein  $\alpha$ -Aminosäurederivat/Iminosäurederivat, vorzugsweise N<sup>ε</sup>-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Tryptophan, L-Prolin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z.B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate fungieren. Derartige Verbindungen und deren Herstellung wurden in einem früheren Patent beschrieben (K. Neubert et al. DD296075A5).

Bevorzugte Inhibitoren für die Alanyl-Aminopeptidase sind Bestatin (Ubenimex), Actinonin, Probestin, Phebestin, RB3014 oder Leuhistin.

Die Inhibitoren werden simultan mit bekannten Trägerstoffen verabreicht. Die Verabreichung erfolgt einerseits als topische Applikation in Form von z.B. Cremes, Salben, Pasten, Gelen, Lösungen, Sprays, Liposomen, Schüttelmixturen, Hydrokolloidverbänden, Pflaster und ähnliche neue Trägersubstrate, Jet-Injektion bzw. anderen dermatologischen Grundlagen/Vehikeln einschließlich instilativer Applikation und andererseits als systemische Applikation zur oralen, transdermalen, intravenösen, subcutanen, intracutanen, intramuskulären Anwendung in geeigneten Rezepturen bzw. in geeigneter Galenik.

Tabelle 1:

epidermale Hyperproliferationszustände
--

	z. B. nicht entzündlich	z. B. entzündlich
noide titis)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- congenitale Ichthyosen</li> <li>- acquirierte Ichthyosen (paraneoplast.)</li> <li>- Palmoplantarkeratosen</li> <li>- congenital</li> <li>- erworben/paraneoplast.</li> <li>- M. Darier</li> <li>- Epidermale Naevi</li> <li>- Cutis rhomboidalis nuchae</li> <li>- Acanthosis nigricans</li> <li>- Pachydermie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Psoriasis und Subtypen einschließlich Nägel und Haare</li> <li>- Lichen ruber und Subtypen</li> <li>- Parapsoriasis-Gruppe</li> <li>- Keratosis lichenoides</li> <li>- Lichen simplex chronicus + reaktive lichen</li> <li>- Hyperproliferationen (z. B. atopische Dermatitis)</li> <li>- Lichenoide Reaktionen bei GvHD</li> <li>- ILVEN-Naevus</li> <li>- Lupus erythematoses chron. disc./SCLE/SLE</li> <li>- Pityriasis rubra pilaris</li> <li>- M. Grover</li> <li>- Vitiligo</li> <li>- mit Hyperproliferation von Keratinozyten einhergehende Erythrodermien</li> </ul>

umschriebene epidermale clonale Expansion
---

benigne	maligne
<ul style="list-style-type: none"> <li>- HPV-assoziiert (Warzen/Condylome)</li> <li>- seborrhoische Keratosen</li> <li>- Hidroakanthome/Porome</li> <li>- Epidermalcysten</li> <li>- Milien</li> <li>- M. Gottron</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- HPV-assoziierte Tumoren</li> <li>- aktinische Keratosen/Präcancerosen</li> <li>- M. Bowen + Bowen-CA</li> <li>- M. Paget + Paget-CA</li> <li>- Plattenepithel-CA</li> <li>- Merkelcell-CA</li> </ul>

follikuläre Hyperproliferationszustände
---

benigne	maligne
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Keratosis follicularis</li> <li>- folliculäre Hyperkeratosen</li> <li>- Ulerythema ophryogenes</li> <li>- Hypertrichosen</li> <li>- Trichilemmalcysten</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Haarfollikelzelltumoren</li> <li>- Proliferierende Trichilemmalcysten</li> <li>- Mischtumoren</li> </ul>

epitheliale Adnextumoren
--------------------------

benigne

maligne

- Porom
- syringoductale Tumoren
- Hidradenome
- Spiradenome
- Cylindrome

- ekkrine/apokrine CA's und Subtypen

primäre und reaktive Nagelzellhyperproliferation
--

- congenital
- z. B. Pachyonychien

nicht infektiös  
erworben  
infektiös bei Mykosen

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert, ohne auf diese beschränkt zu sein.

**Beispiel 1**

**Inhibierung der DNS-Synthese von humanen T-Lymphozyten durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und der APN**

Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DNS-Synthese humaner peripherer T-Lymphozyten durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-thiazolidid = I49) und APN (Actinonin) in additiver bis superadditiver Weise gehemmt wird. Die T-Zellen wurden 72 h in Gegenwart der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der <sup>3</sup>[H]-Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354-360). Abbildung 1 (Seite 1/14) zeigt die dosisabhängige, additive bis superadditive Hemmung der DNS-Synthese.

**Beispiel 2**

**Inhibierung der DNS-Synthese von humanen peripheren mononukleären Zellen durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und der APN**



Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DNS-Synthese humaner peripherer mononukleärer Zellen (MNZ) durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-thiazolidid = I49) und APN (Actinonin) in additiver bis superadditiver Weise gehemmt wird. Die MNZ wurden 72 h in Gegenwart der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der <sup>3</sup>[H]-Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354-360). Abbildung 2 (Seite 2/14) zeigt die dosisabhängige, additive bis superadditive Hemmung der DNS-Synthese.

### **Beispiel 3**

#### **Inhibierung der DNS-Synthese von humanen T-Lymphozyten durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und der POP**

Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DNS-Synthese humaner T-Lymphozyten durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-thiazolidid = I49) und der Prolyl oligopeptidase (Boc-Ala-Thiazolidid) in additiver bis superadditiver Weise gehemmt wird. Die T-Zellen wurden 72 h in Gegenwart der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der <sup>3</sup>[H]-Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354-360). Abbildung 3 (Seite 3/14) zeigt die dosisabhängige, additive bis superadditive Hemmung der DNS-Synthese.

### **Beispiel 4**

#### **Inhibierung der DNS-Synthese von humanen peripheren mononukleären Zellen durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und der POP**

Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DNS-Synthese humaner peripherer mononukleärer Zellen (MNZ) durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-thiazolidid = I49) und der Prolyl oligopeptidase (Boc-Ala-Thiazolidid) verstärkt gehemmt wird. Die MNZ wurden 72 h in Gegenwart der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der <sup>3</sup>[H]-Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie

bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor  $\beta$ 1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354-360). Abbildung 4 (Seite 4/14) zeigt die dosisabhängige, verstärkte Hemmung der DNS-Synthese.

#### **Beispiel 5**

##### **Inhibierung der DNS-Synthese von humanen T-Lymphozyten durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und des ACE**

Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DNS-Synthese humaner T-Lymphozyten durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-thiazolidid = I49) und des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (Captopril) in additiver bis superadditiver Weise gehemmt wird. Die T-Zellen wurden 72 h in Gegenwart der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der <sup>3</sup>[H]-Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor  $\beta$ 1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354-360). Abbildung 5 (Seite 5/14) zeigt die dosisabhängige, additive bis superadditive Hemmung der DNS-Synthese.

#### **Beispiel 6**

##### **Inhibierung der DNS-Synthese von humanen peripheren mononukleären Zellen durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und des ACE**

Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DNS-Synthese humaner peripherer mononukleärer Zellen (MNZ) durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-thiazolidid = I49) und des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (Captopril) in additiver bis superadditiver Weise gehemmt wird. Die MNZ wurden 72 h in Gegenwart der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der <sup>3</sup>[H]-Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor  $\beta$ 1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354-360). Abbildung 6 (Seite 6/14) zeigt die dosisabhängige, additive bis superadditive Hemmung der DNS-Synthese.

**Beispiel 7**

Hemmung der Proliferation von humanen peripheren mononukleären Zellen (MNZ) durch die einzelne und gleichzeitige Gabe von Hemmstoffen der DP IV (I49 = Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-thiazolidid) und APN (Actinonin). (Abbildung 7: Seite 7/14)

**Beispiel 8**

Hemmung der Proliferation der humanen T-Zelllinie KARPAS-299 durch die einzelne und gleichzeitige Gabe von Hemmstoffen der DP IV (I49 = Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-thiazolidid) und APN (Actinonin und Probestin). (Abbildung 8: Seite 8/14)

**Beispiel 9**

Hemmung der Proliferation aktivierter, humaner peripherer T-Zellen durch die einzelne bzw. gleichzeitige Gabe von Hemmstoffen der DP IV (I49 = Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-thiazolidid) und APN (Actinonin und Probestin). (Abbildung 9: Seite 9/14)

**Beispiel 10**

Hemmung der Proliferation PHA-aktivierter, humaner mononukleärer Zellen (MNZ) durch die einzelne bzw. gleichzeitige Gabe von Hemmstoffen der DP IV (I49 = Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-thiazolidid) und der X-Pro-Aminopeptidase (APP) (Apstatin). (Abbildung 10: Seite 10/14)

**Beispiel 11**

Inhibierung der DNS-Synthese Pokeweed-Mitogen (PWM)-stimulierter humaner mononukleärer Zellen (MNZ) des peripheren Blutes durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und der APN

Unsere Untersuchungen zeigen, dass die DNS-Synthese Pokeweed-Mitogen-stimulierter humaner MNZ des peripheren Blutes durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-thiazolidid = I49) und APN (Bestatin) in additiver Weise gehemmt wird. Die MNZ wurden 72 h in Gegenwart von Pokeweed-Mitogen und der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der <sup>3</sup>[H]-Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor  $\beta$ 1 in PWM-stimulated

PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354-360). Abbildung 11 (Seite 11/14) zeigt die dosisabhängige, additive Hemmung der DNS-Synthese.

### **Beispiel 12**

**Inhibierung der IL-4-Produktion Pokeweed-Mitogen-stimulierter humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und der APN**

Unsere Untersuchungen zeigen den interessanten Befund, dass die Produktion des für  $T_{H2}$ -Zellen charakteristischen Zytokins IL-4 von Pokeweed-Mitogen-stimulierten humanen mononukleären Zellen (MNZ) des peripheren Blutes durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-thiazolidid = I49) und der APN (Bestatin) in superadditiver Weise gehemmt wird. Die MNZ wurden 48 h in Gegenwart von Pokeweed-Mitogen und der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend mittels kommerzieller IL-4-Bestimmungskits (ELISA) die Konzentrationen des IL-4 in den entsprechenden Kulturüberständen bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor  $\beta$ 1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354-360). Abbildung 12 (Seite 12/14) zeigt die dosisabhängige, superadditive Hemmung der IL-4-Produktion.

### **Beispiel 13**

**Inhibierung der DNS-Synthese humaner Keratinozyten (HaCaT-Zelllinie) durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und der APN**

Unsere Untersuchungen zeigen, dass die DNS-Synthese humaner HaCaT-Keratinozyten durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-thiazolidid = I49) und APN (Actinonin) in additiver und bei kleineren Konzentrationen auch in superadditiver Weise gehemmt wird.

Die humane Keratinozytenzelllinie HaCat, welche als Zellmodell für die Psoriasis akzeptiert ist, exprimiert DP IV und APN. Die Enzymaktivität der DP IV von vitalen Zellen beträgt  $30,2 \pm 5$  pkat/ $10^6$  Zellen, die der APN beträgt  $90 \pm 4$  pkat/ $10^6$  Zellen. Entsprechend ist die mRNA von APN und DP IV auf diesen Zellen nachweisbar (Abb. 13, Seite 13/14)).

HaCaT-Zellen wurden 48 h mit den oben genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor  $\beta 1$  in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354-360). Abbildung 14 (Seite 14/14) zeigt die dosisabhängige Hemmung der DNS-Synthese.

**Patentansprüche**

1. Verwendung von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) sowie von Enzymen mit gleicher Substratspezifität (DP IV-analoge Enzymaktivität) in Kombination mit Inhibitoren der Alanyl-Aminopeptidase (Aminopeptidase N, APN) bzw. Enzymen gleicher Substratspezifität (APN-analoge Enzymaktivität) zur additiven bis superadditiven Hemmung von Aktivierung und Proliferation (DNS-Synthese) humaner T-Lymphozyten bzw. mononukleärer Zellen und Produktion von  $T_{H2}$ -Zytokinen.
2. Verwendung von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) sowie von Enzymen mit gleicher Substratspezifität (DP IV-analoge Enzymaktivität) in Kombination mit Inhibitoren der Alanyl-Aminopeptidase (Aminopeptidase N, APN) bzw. Enzymen gleicher Substratspezifität (APN-analoge Enzymaktivität) zur additiven bis superadditiven Hemmung von Aktivierung, Proliferation (DNS-Synthese) humaner epidermaler und follikulärer Keratinozyten sowie solcher der Übergangszone von Haut zu Schleimhaut.
3. Verwendung von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) sowie von Enzymen mit gleicher Substratspezifität (DP IV-analoge Enzymaktivität) in Kombination mit Inhibitoren der Alanyl-Aminopeptidase (Aminopeptidase N, APN) bzw. Enzymen gleicher Substratspezifität (APN-analoge Enzymaktivität), der X-Pro-Aminopeptidase (Aminopeptidase P, APP), des „angiotensin-converting enzyme“ (ACE) und/oder der Prolyloloigopeptidase (POP, Prolylendopeptidase, PEP) zur additiven bis superadditiven Hemmung von Aktivierung, DNS-Synthese und Proliferation humaner T-Lymphozyten bzw. mononukleärer Zellen.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin die Inhibitoren der DP IV bevorzugt Xaa-Pro-Dipeptide (Xaa =  $\alpha$ -Aminosäure bzw. seitenkettengeschütztes Derivat), entsprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylester, Dipeptidboronsäuren (z.B. Pro-boro-Pro) und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)<sub>n</sub>-Peptide (Xaa =  $\alpha$ -Aminosäure, n=0-10), entsprechende Derivate und deren Salze bzw. Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Derivate und deren Salze sind, wobei Xaa eine  $\alpha$ -Aminosäure bzw.

ein seitenkettengeschütztes Derivat, vorzugsweise N<sup>ε</sup>-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, L-Prolin, L-Tryptophan, L-Isoleucin, L-Valin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z.B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate fungieren.

5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin Aminosäureamide, z.B. N<sup>ε</sup>-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin-thiazolidid, -pyrrolidid und -piperidid sowie das entsprechende 2-Cyanothiazolidid-, 2-Cyanopyrrolidid- und 2-Cyanopiperidid-Derivat bevorzugt als DP IV-Inhibitoren eingesetzt werden.
6. Verwendung nach Anspruch 1, wobei als Inhibitoren der APN bevorzugt Actinoin, Leuhistin, Phebestin, Amastatin, Bestatin, Probestin, β-Aminothiole, α-Aminophosphinsäuren, α-Aminophosphinsäurederivate, vorzugsweise D-Phe-ψ[PO(OH)-CH<sub>2</sub>]-Phe-Phe und deren Salze fungieren.
7. Verwendung nach Anspruch 3, wobei als Inhibitoren der APP bevorzugt Apstatin, (2S,3R)-HAMH-L-Prolin, (2S,3R)-HAPB-L-Prolin, die entsprechenden L-Prolinmethylester, (2S,3R)-HAMH-/(2S,3R)-HAPB-pyrrolidide, -thiazolidide (HAMH = 3-Amino-2-hydroxy-5-methyl-hexanoyl, HAPB = 3-Amino-2-hydroxy-4-phenyl-butanoyl) und deren Salze fungieren.
8. Verwendung nach Anspruch 3 oder Anspruch 7, worin als Inhibitoren des ACE bevorzugt Captopril, Enalapril, Lisinopril, Cilazopril und deren Salze fungieren.
9. Verwendung nach einem der Ansprüche 3, 7 oder 8, worin als Inhibitoren der POP (PEP) bevorzugt Postatin, Eurystatin A oder B, N<sup>α</sup>-geschützte Peptidaldehyde, vorzugsweise Benzyloxycarbonyl-L-Prolyl-L-Prolinal bzw. Benzyloxycarbonyl-L-Thioproyl-L-Thioprolinal, N<sup>α</sup>-geschützte Aminosäure(Xaa)-pyrrolidide bzw. -thiazolidide (Xaa = α-Aminosäure, bevorzugt L-Alanin, L-Valin, L-Isoleucin) sowie die entsprechenden 2-Cyanopyrrolidid- bzw. 2-Cyanothiazolididderivate, substratanaloge N<sup>α</sup>-geschützte Peptidphosphonsäurediarylester bzw. Peptiddiazomethylketone bzw. Peptidammoniummethylketone und deren Salze fungieren.

10. Verwendung von Inhibitorkombinationen nach einem der Ansprüche 1 und 4 bis 9 zur Vorbeugung und Therapie von chronischen Erkrankungen mit entzündlicher Genese wie Autoimmunerkrankungen und Arteriosklerose.
11. Verwendung von Inhibitorkombinationen nach einem der Ansprüche 1 und 4 bis 6 zur Vorbeugung und Therapie von allergischen Reaktionen vom Typ I.
12. Verwendung von Inhibitorkombinationen nach einem der Ansprüche 1, 2 und 4 bis 6 zur Vorbeugung und Therapie von entzündlichen und nicht entzündlichen epidermalen Hyperproliferationszuständen (z. B. congenitale Ichthyosen und Psoriasis), benignen und malignen umschriebenen epidermalen clonalen Expansionen (z. B. Warzen, Condylome, aktinische Keratosen/-Präcancerosen), benignen und malignen Hyperproliferationszuständen (z. B. Keratosis follicularis) als auch benignen und malignen epithelialen Adnextumoren und primären und reaktiven Nagelzellhyperproliferationen.
13. Pharmazeutische Zubereitungen, umfassend Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) oder DP IV-analoger Enzymaktivität in Kombination mit Inhibitoren eines der Enzyme Alanyl-Amino-peptidase (Amino-peptidase N, APN) bzw. Enzymen gleicher Substratspezifität (APN-analoge Enzymaktivität) und in Kombination mit an sich bekannten Träger-, Zusatz- und/oder Hilfsstoffen.
14. Pharmazeutische Zubereitungen, umfassend Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) oder DP IV-analoger Enzymaktivität in Kombination mit Inhibitoren eines der Enzyme Alanyl-Amino-peptidase (Amino-peptidase N, APN) bzw. Enzymen gleicher Substratspezifität (APN-analoge Enzymaktivität), X-Pro-Amino-peptidase (Amino-peptidase P, APP), „angiotensin-converting enzyme“ (ACE) und Prolyl-oligo-peptidase (POP, Prolyl-endopeptidase, PEP) und in Kombination mit an sich bekannten Träger-, Zusatz- und/oder Hilfsstoffen.
15. Pharmazeutische Zubereitungen nach Anspruch 13 oder Anspruch 14, umfassend als Inhibitoren der DP IV bevorzugt Xaa-Pro-Dipeptide (Xaa =  $\alpha$ -Aminosäure bzw. seitenketten-geschützte Derivate), entsprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylester, Dipeptidboronsäuren (z.B. Pro-boro-Pro) und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-

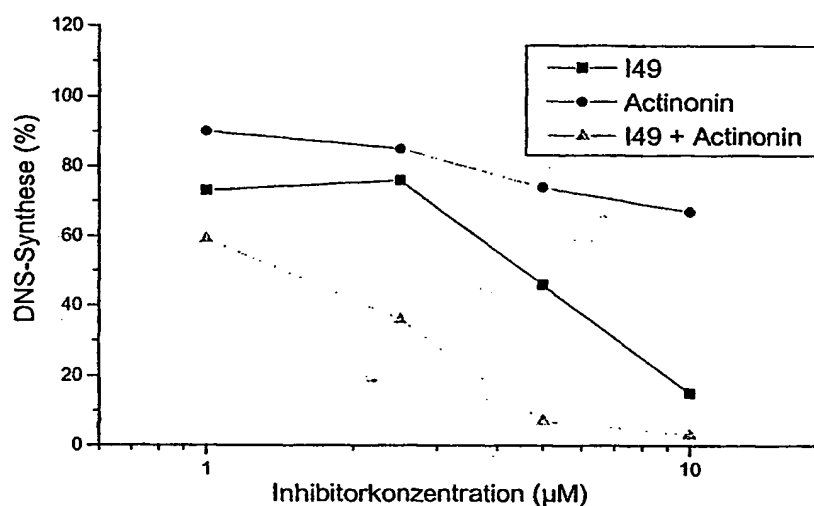


(Xaa)<sub>n</sub>-Peptide (Xaa =  $\alpha$ -Aminosäuren, n=0 bis 10), entsprechende Derivate und deren Salze bzw. Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Derivate und deren Salze, wobei Xaa eine  $\alpha$ -Aminosäure bzw. seitenkettengeschütztes Derivat, vorzugsweise N<sup>ε</sup>-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, L-Prolin, L-Tryptophan, L-Isoleucin, L-Valin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z.B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate fungieren.

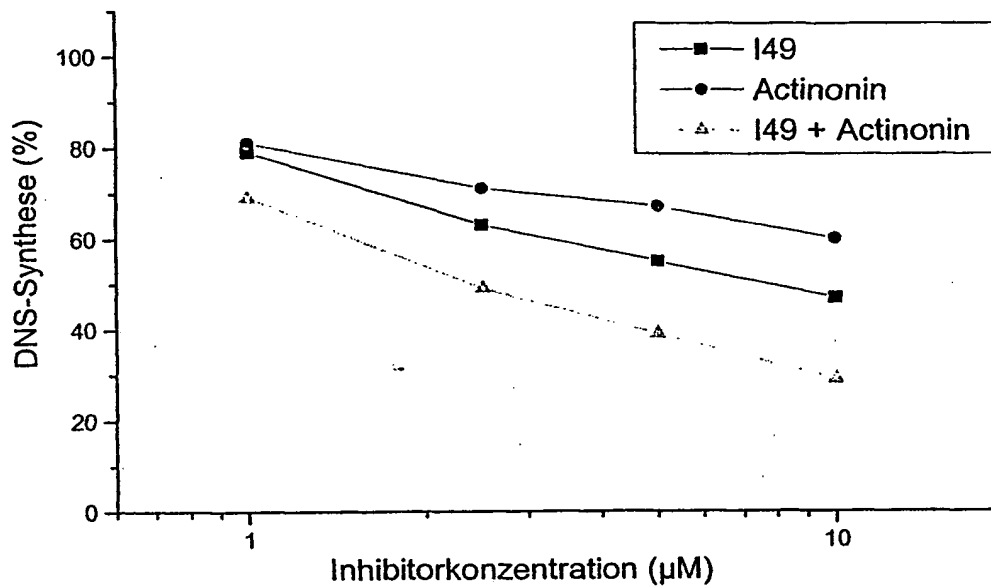
16. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 13, 14 oder 15, umfassend als Inhibitoren der DP IV vorzugsweise Aminosäureamide, z.B. N<sup>ε</sup>-4-Nitrobenzyloxy-carbonyl-L-Lysinthiazolidid, -pyrrolidid und -piperidid sowie das entsprechende 2-Cyanothiazolidid-, 2-Cyanopyrrolidid- und 2-Cyanopiperidid-Derivat.
17. Pharmazeutische Zubereitungen nach einem der Ansprüche 13 bis 16, umfassend als Inhibitoren der APN vorzugsweise Actinoin, Leuhistin, Phebestin, Amastatin, Bestatin, Probestin,  $\beta$ -Aminothirole,  $\alpha$ -Aminophosphinsäuren,  $\alpha$ -Aminophosphinsäurederivate, bevorzugt D-Phe- $\Psi$ [PO(OH)-CH<sub>2</sub>]-Phe-Phe und deren Salze.
18. Pharmazeutische Zubereitungen nach einem der Ansprüche 14 bis 17, umfassend als Inhibitoren der APP vorzugsweise Apstatin, (2S,3R)-HAMH-L-Prolin, (2S,3R)-HAPB-L-Prolin, die entsprechenden L-Prolinmethylester, (2S,3R)-HAMH- / (2S,3R)-HAPB-pyrrolidide, -thiazolidide (HAMH = 3-Amino-2-hydroxy-5-methyl-hexanoyl, HAPB=3-Amino-2-hydroxy-4-phenyl-butanoyl) und deren Salze.
19. Pharmazeutische Zubereitungen nach einem der Ansprüche 14 bis 18, umfassend als Inhibitoren der ACE Captopril, Enalapril, Lisinopril, Cilazopril und deren Salze .
20. Pharmazeutische Zubereitungen nach einem der Ansprüche 14 bis 19, umfassend als Inhibitoren der POP (PEP) Postatin, Eurystatin A oder B, N<sup>a</sup>-geschützte Peptidaldehyde, vorzugsweise Benzyloxycarbonyl-L-Prolyl-L-Prolinal bzw. Benzyloxycarbonyl-L-Thioprollyl-L-Thioprolinal, N<sup>a</sup>-geschützte Aminosäure(Xaa)-pyrrolidide bzw. -thiazolidide (Xaa =  $\alpha$ -Aminosäure, bevorzugt L-Alanin, L-Valin, L-Isoleucin) sowie die entsprechenden 2-Cyanopyrrolidid- bzw. 2-Cyanothiazolididderivate, substratanaloge N<sup>a</sup>-geschützte Pep-

tidphosphonsäurediarylester bzw. Peptiddiazomethylketone bzw. Peptidammonium-methylketone und deren Salze.

21. Pharmazeutische Zubereitungen nach einem der Ansprüche 14 bis 20, umfassend zwei oder mehr Inhibitoren der DP IV bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität, der APN bzw. APN-analoger Enzymaktivität, des ACE, der POP (PEP) und der XPNPEP2 in räumlich getrennter Formulierung in Kombination mit an sich bekannten Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffen zur gleichzeitigen oder zeitlich unmittelbar aufeinanderfolgenden Verabreichung mit dem Ziel einer gemeinsamen Wirkung.
22. Pharmazeutische Zubereitungen nach einem der Ansprüche 13 bis 21 für die systemische Anwendung zur oralen, transdermalen, intravenösen, subcutanen, intracutanen, intramuskulären, rektalen, vaginalen, sublingualen Applikation zusammen mit an sich bekannten Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffen.
23. Pharmazeutische Zubereitungen nach einem der Ansprüche 13 bis 21 für die topische Anwendung in Form von z.B. Cremes, Salben, Pasten, Gelen, Lösungen, Sprays, Liposomen, Schüttelmixturen, Hydrokolloidverbänden bzw. anderen dermatologischen Grundlagen/Vehikeln, einschließlich instilativer Applikation.

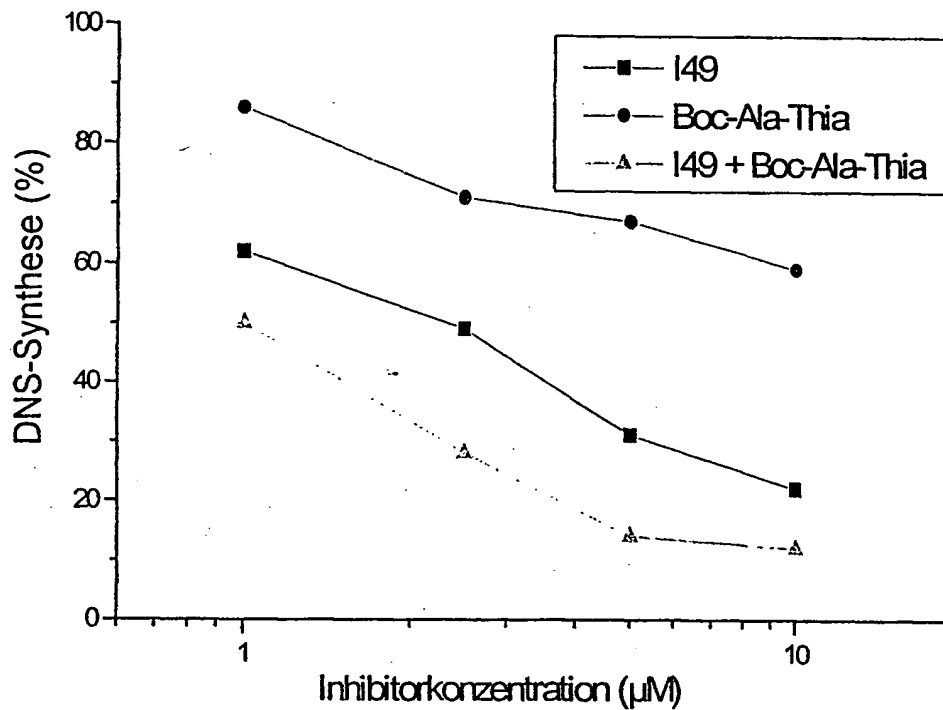


**Abb. 1:** Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und der Aminopeptidase N (Actinonin) auf die DNS-Synthese humaner T-Lymphozyten. Humane periphere T-Zellen wurden über drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium  $^3\text{H}$ -Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an  $^3\text{H}$ -Thymidin gemessen.

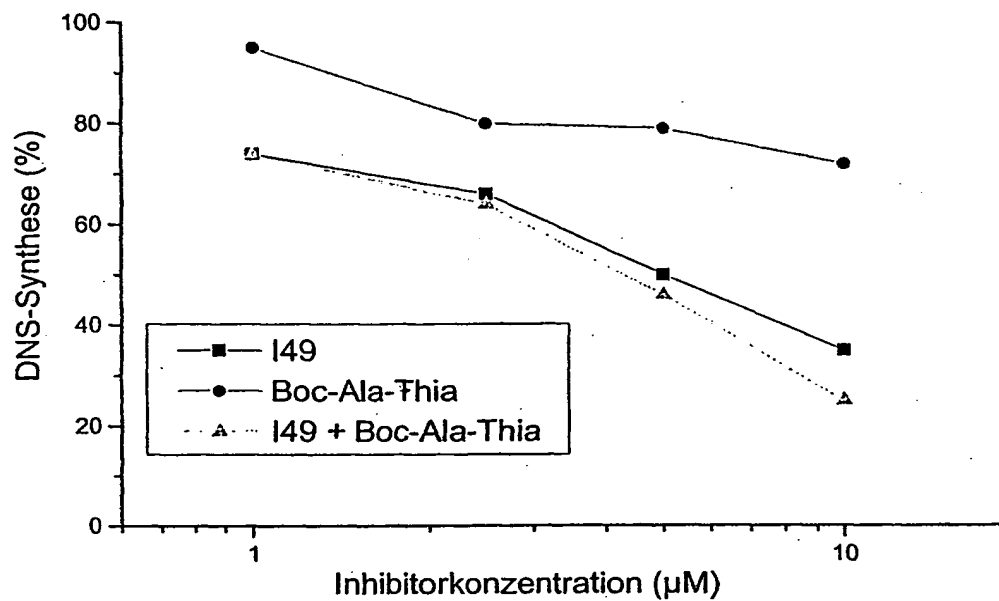


**Abb. 2:** Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und der APN (Actinonin) auf die DNS-Synthese humaner mononukleärer Zellen (MNZ). Humane MNZ wurden über drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium  $^3\text{[H]}$ -Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an  $^3\text{[H]}$ -Thymidin gemessen.

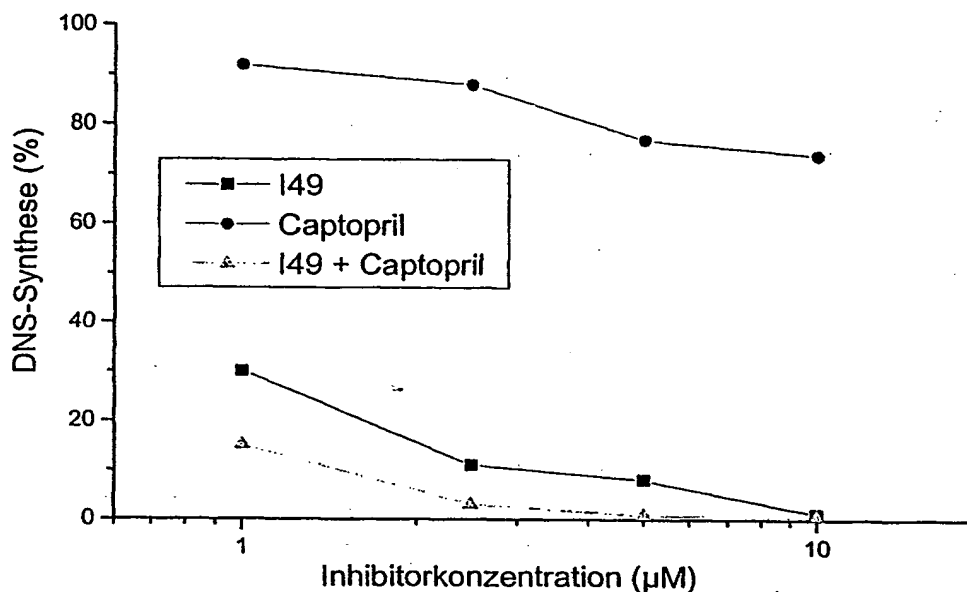
3/14



**Abb. 3:** Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und der Prolyl oligopeptidase (Boc-Ala-Thia) auf die DNS-Synthese humaner peripherer T-Lymphozyten. Humane T-Zellen wurden über drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium  $^3\text{H}$ -Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an  $^3\text{H}$ -Thymidin gemessen.

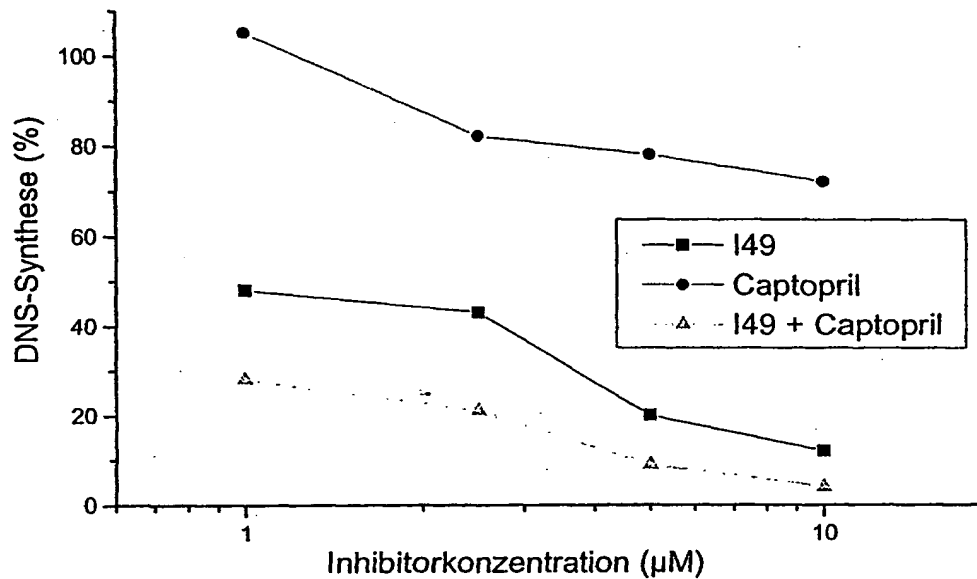


**Abb. 4:** Verstärkter und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und der Prolyl oligopeptidase (Boc-Ala-Thia) auf die DNS-Synthese humaner mononukleärer Zellen (MNZ). Humane MNZ wurden über drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium  $^3\text{H}$ -Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an  $^3\text{H}$ -Thymidin gemessen.



**Abb. 5:** Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (Captopril) auf die DNS-Synthese humaner peripherer T-Lymphozyten. Humane T-Zellen wurden über drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium  $^3\text{H}$ -Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an  $^3\text{H}$ -Thymidin gemessen.

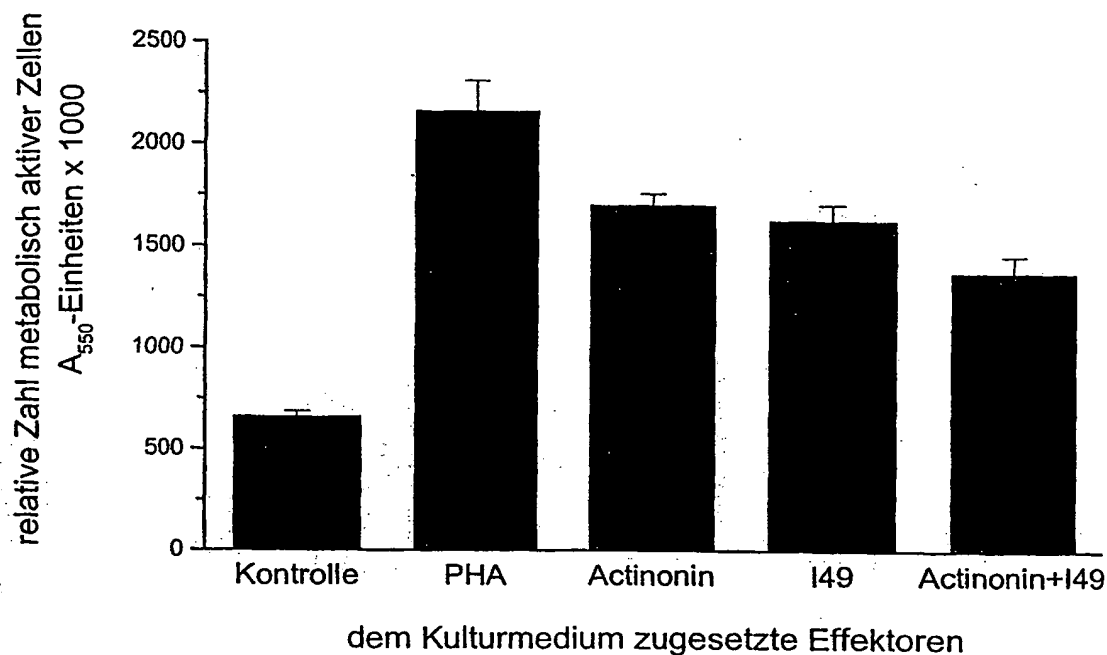
6/14



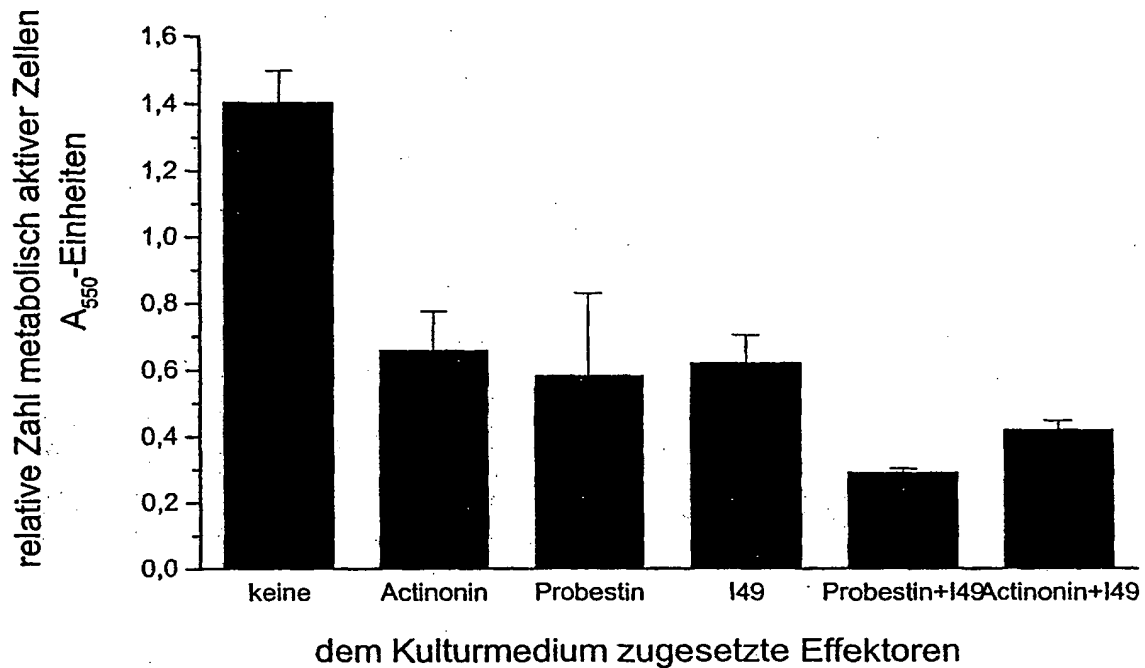
**Abb. 6:** Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und des Aangiotensin-konvertierenden Enzyms (Captopril) auf die DNS-Synthese humaner mononukleärer Zellen (MNZ). Humane MNZ wurden über drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium  $^3\text{H}$ -Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an  $^3\text{H}$ -Thymidin gemessen.



7/14

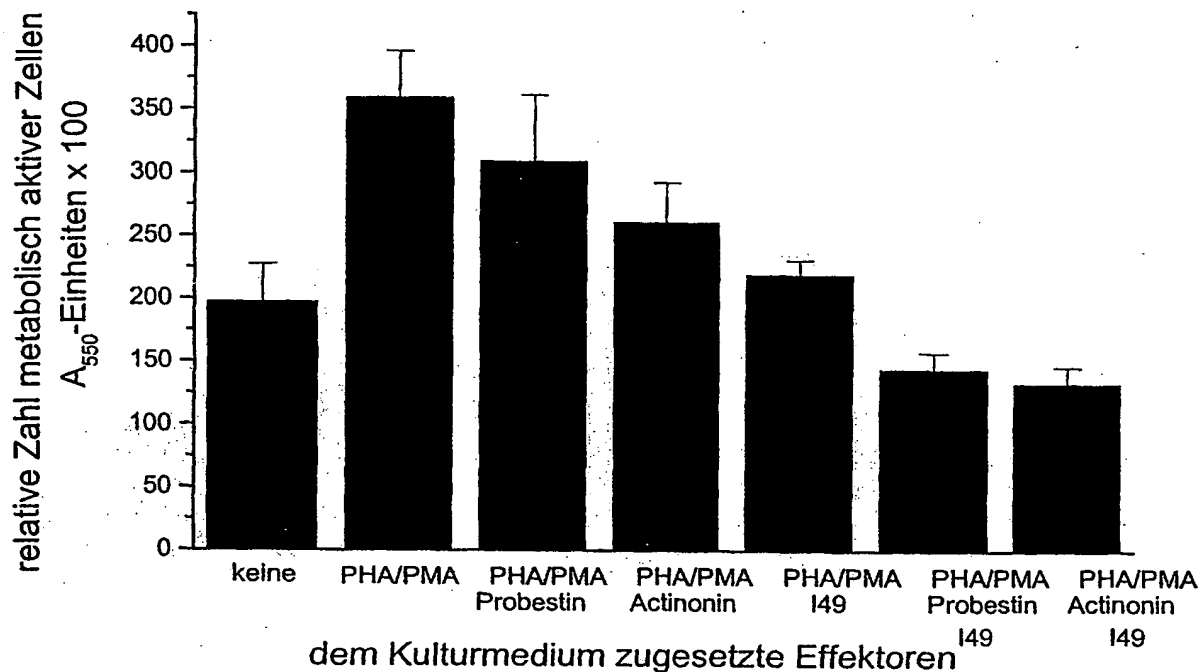


**Abb. 7:** Die MNZ wurden über einen Zeitraum von 72 h ohne Zusatz (Kontrolle), mit dem mitogenen Lektin Phytohämagglutinin (PHA) bzw. mit PHA und den angegebenen Inhibitoren inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zahl metabolisch aktiver Zellen unter Verwendung des kommerziell verfügbaren WST-1 Zell-Proliferations-Assays (Takara Inc.) nach Angaben des Herstellers.



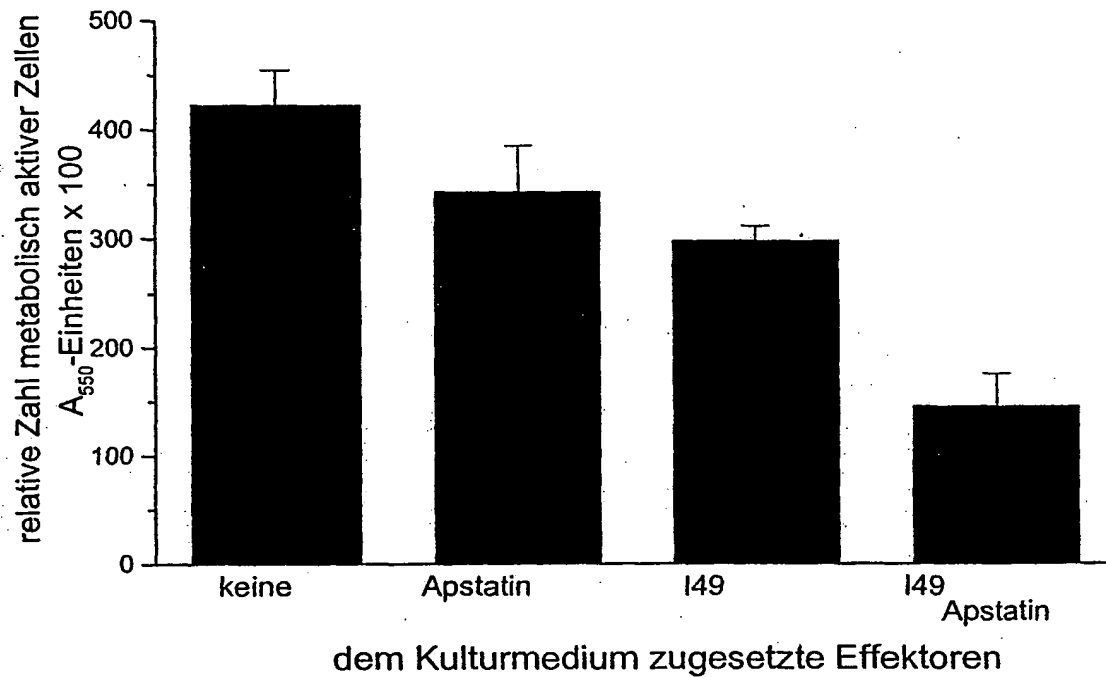
**Abb. 8:** Die KARPAS-299-Zellen wurden über einen Zeitraum von 72 h ohne Zusatz (Kontrolle) bzw. in Gegenwart der angegebenen Inhibitoren einzeln sowie in Kombination inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zahl metabolisch aktiver Zellen unter Verwendung des kommerziell verfügbaren WST-1 Zell-Proliferations-Assays (Takara Inc.) nach Angaben des Herstellers.

9/14



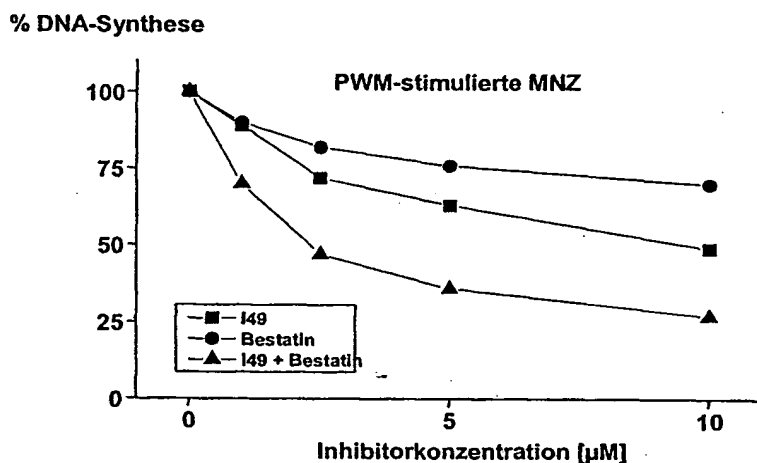
**Abb. 9:** Die T-Zellen wurden mit Ausnahme der unbehandelten Kontrolle durch Zugabe zum Kulturmedium von Phytohämagglutinin und Phorbol-12-myristat-13-acetat aktiviert und über einen Zeitraum von 72 h in Gegenwart der angegebenen Inhibitoren einzeln sowie in Kombination inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zahl metabolisch aktiver Zellen unter Verwendung des kommerziell verfügbaren WST-1 Zell-Proliferations-Assays (Takara Inc.) nach Angaben des Herstellers.

10/14



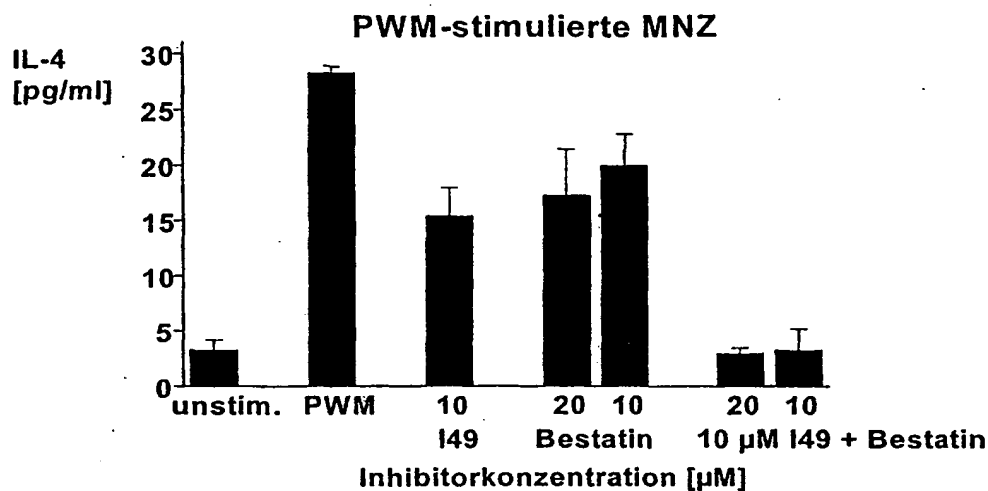
**Abb. 10:** Die mononukleären Zellen (MNZ) wurden über einen Zeitraum von 72 h in Gegenwart der angegebenen Inhibitoren einzeln sowie in Kombination inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zahl metabolisch aktiver Zellen unter Verwendung des kommerziell verfügbaren WST-1 Zell-Proliferations-Assays (Takara Inc.) nach Angaben des Herstellers.

11/14

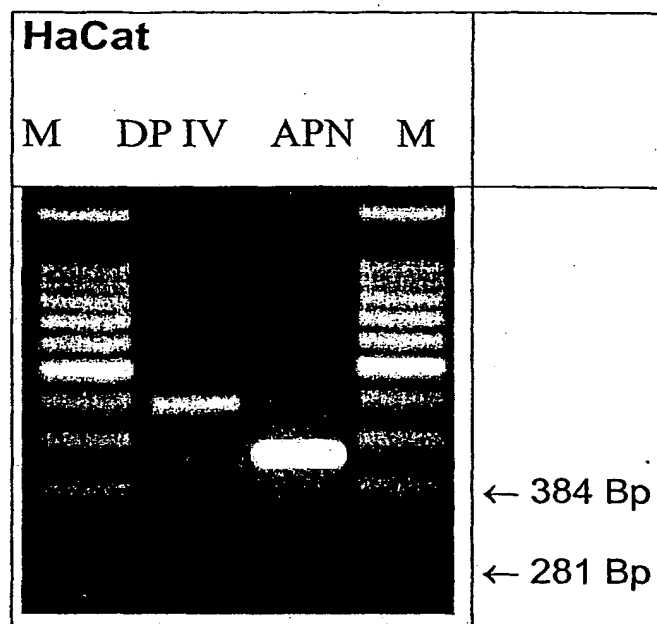


**Abb. 11:** Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und der Aminopeptidase N (Bestatin) auf die DNS-Synthese humaner PWM-stimulierter MNZ. Humane periphere MNZ wurden über drei Tage mit PWM (2  $\mu$ g/ml) und den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium  $^3$ [H]-Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an  $^3$ [H]-Thymidin gemessen.

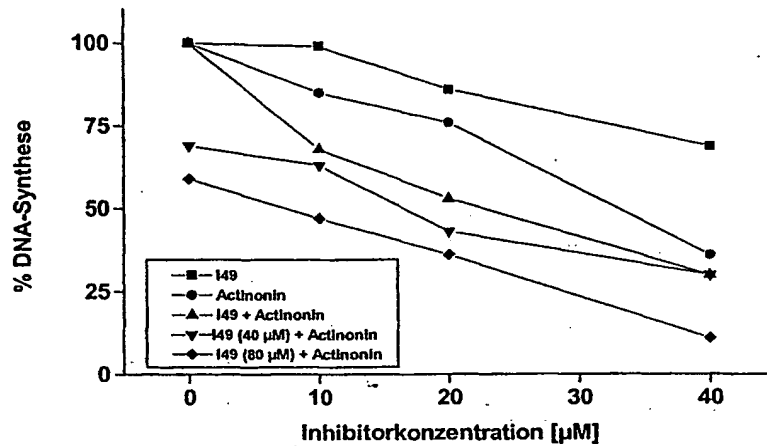
12/14



**Abb. 12:** Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und der Aminopeptidase N (Bestatin) auf die IL-4-Produktion humaner, PWM-stimulierter MNZ. Humane periphere MNZ wurden über 48 h mit PWM (2 µg/ml) und den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurden mittels IL-4-ELISA die Konzentrationen von IL-4 in den entsprechenden Kulturüberständen gemessen.



**Abb. 13:** Nachweis der mRNA-Expression von DP IV und APN auf HaCaT-Keratinocyten mittels RT-PCR



**Abb. 14:** Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und der Aminopeptidase N (Actinonin) auf die DNS-Synthese humaner HaCaT-Keratinocyten. Die Zellen wurden über 48 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium 3[H]-Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an 3[H]-Thymidin gemessen.



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
11. Juli 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/053170 A3

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: A61K 45/06,  
A61P 37/06, 35/00, A61K 38/55 // (A61K 38/55, 38:55)

101 55 093.6 9. November 2001 (09.11.2001) DE

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/15199

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): INSTITUT FÜR MEDIZINTECHNOLOGIE  
MAGDEBURG GMBH (IMTM) [DE/DE]; Leipziger  
Strasse 44, 39120 Magdeburg (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
21. Dezember 2001 (21.12.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(72) Erfinder; und

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ANSORGE, Siegfried  
[DE/DE]; Am Sportplatz 17, 39291 Hohenwarte (DE).  
LENDECKEL, Uwe [DE/DE]; Institut für Experi-  
mentelle Innere Medizin der Uni, versitätsklinik Magde-  
burg, Leipziger Strasse 44, 39120 Magdeburg (DE).  
NEUBERT, Klaus [DE/DE]; Martin-Luther-Universität

(30) Angaben zur Priorität:  
101 00 052.9 2. Januar 2001 (02.01.2001) DE  
101 02 392.8 19. Januar 2001 (19.01.2001) DE

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: COMBINED USE OF ENZYME INHIBITORS AND PHARMACEUTICAL PREPARATIONS THEREOF FOR THE  
TREATMENT AND PROPHYLAXIS OF ARTERIOSCLEROSIS, FOR THE TREATMENT AND PREVENTION OF ALLERGIC  
REACTIONS OF TYPE I ACCORDING TO THE GELL AND COOMBS CLASSIFICATION, AND FOR THE TREATMENT  
AND PREVENTION OF DERMATOLOGICAL DISEASES ASSOCIATED WITH FO

(54) Bezeichnung: KOMBINIERTER VERWENDUNG VON ENZYMINHIBITOREN UND PHARMAZEUTISCHEN ZUBEREI-  
TUNGEN DARAUS ZUR THERAPIE UND PROPHYLAXE DER ARTERIOSKLEROSE, ZUR THERAPIE UND PRÄVENTION  
ALLERGISCHER REAKTIONEN VON TYP I NACH GELL UND COOMBS UND ZUR THERAPIE UND PRÄVENTION DER-  
MATOLOGISCHER ERKRANKUNGEN MIT FOLLIKULÄREN UND EPIDERMALEN HYPERKERATOS

(57) Abstract: The invention relates to the use of inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) and enzymes having the same  
specific nature of substrate (DP IV enzyme activity), combined with inhibitors of alanyl aminopeptidase (aminopeptidase N, APN),  
or enzymes having the same specific nature of substrate (APN enzyme activity), for the additive to superadditive inhibition of the  
activation and proliferation (DNS synthesis) of human T lymphocytes or mononuclear cells and of the production of T<sub>H2</sub> cytokines  
for the treatment and prevention of allergic reactions of type I according to the Gell and Coombs classification, for the additive  
to superadditive inhibition of the activation and proliferation (DNS synthesis) of human epidermal and follicular keratinocytes and  
those of the transitional region between the skin and the mucosa, and for the treatment and prevention of dermatological diseases  
associated with follicular and epidermal hyperkeratosis and reinforced keratinocyte proliferation. The invention also relates to the  
use of inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) and enzymes having the same specific nature of substrate (DP IV enzyme  
activity), combined with inhibitors of alanyl aminopeptidase (aminopeptidase N, APN), or enzymes having the same specific nature  
of substrate (APN enzyme activity), inhibitors of X-pro-aminopeptidase (aminopeptidase P, APP), inhibitors of the angiotensin-  
converting enzyme (ACE) and/or of prololigopeptidase (POP, prolendopeptidase, PEP) for the additive to superadditive inhibition  
of the activation, DNS synthesis and proliferation of human T lymphocytes or mononuclear cells for the treatment and prophylaxis  
of arteriosclerosis. The invention further relates to pharmaceutical preparations comprising a plurality of inhibitors of enzymes of  
the above-mentioned groups.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) sowie von En-  
zymen mit gleicher Substratspezifität (DP IV-analoge Enzymaktivität) in Kombination mit Inhibitoren der Alanyl-Aminopeptidase  
(Aminopeptidase N, APN) bzw. Enzymen gleicher Substratspezifität (APN-analoge Enzymaktivität) zur additiven bis superadditiven  
Hemmung von Aktivierung und Proliferation (DNS-Synthese) humaner T-Lymphozyten bzw. mononukleärer Zellen und Produk-  
tion von T<sub>H2</sub>-Zytokinen zur Therapie und Prävention allergischer Reaktionen von Typ I nach Gell und Coombs und zur additiven  
bis superadditiven Hemmung von Aktivierung, Proliferation (DNS-Synthese) humaner epidermaler und follikulärer Keratinozyten  
sowie solcher der Übergangszone von Haut zu Schleimhaut sowie zur Therapie und Prävention dermatologischer Erkrankungen mit  
follikulären und epidermalen Hyperkeratosen und einer verstärkten Keratinozytenproliferation. Die Erfindung betrifft auch die Ver-  
wendung von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) sowie von Enzymen mit gleicher Substratspezifität (DP IV-analoge  
Enzymaktivität) in Kombination mit Inhibitoren der Alanyl-Aminopeptidase (Aminopeptidase N, APN) bzw. Enzymen gleicher  
Substratspezifität (DP

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 02/053170 A3



Biochemie/Biotechnologie, Kurt-Mothes-Strasse 3, 06120 Halle (DE). **REINHOLD, Dirk** [DE/DE]; Institut für Immunologie der Universitätsklinik Magdeburg, Leipziger Strasse 44, 39120 Magdeburg (DE). **VETTER, Robert** [DE/DE]; Universitätsklinik Magdeburg, Leipziger Strasse 44, 39120 Magdeburg (DE). **GOLLNICK, Harald** [DE/DE]; Leipziger Strasse 44, 39120 Magdeburg (DE).

(74) **Anwalt: KOEPE, Gerd, L.;** Koeppe & Partner, Postfach 22 12 64, 80502 München (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, ~~SL~~, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), curasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen**

**Recherchenberichts:**

20. Februar 2003

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

IV-analoge Enzymaktivität), der X-Pro-Aminopeptidase (Aminopeptidase P, APP), des "angiotensin-converting Enzym" (ACE) und/oder der Prolyoligopeptidase (POP, Prolylendopeptidase, PEP) zur additiven bis superadditiven Hemmung von Aktivierung, DNS-Synthese und Proliferation humaner T-Lymphozaten bzw. mononukleärer Zellen zur Therapie und Prophylaxe der Arteriosklerose. Die Erfindung betrifft auch pharmazeutische Zubereitungen, die mehrere Inhibitoren von Enzymen der vorgenannten Gruppen umfassen.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No  
PCT/EP 01/15199

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K45/06 A61P37/06 A61P35/00 A61K38/55 //(A61K38/55, 38:55)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AUGUSTIJNS PATRICK F ET AL: "Transport and metabolism of delta sleep-inducing peptide in cultured human intestinal epithelial cell monolayers." DRUG METABOLISM AND DISPOSITION, vol. 23, no. 12, 1995, pages 1372-1378, XP001094376 ISSN: 0090-9556 page 1376, paragraph 1 - paragraph 2 --- -/--	13-23

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*8\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 October 2002

Date of mailing of the international search report

11/10/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Thalmair, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No

PCT/EP 01/15199

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STEINMETZER T ET AL: "PEPTIDYL AMMONIUM METHYL KETONES AS SUBSTRATE ANALOG INHIBITORS OF PROLINE-SPECIFIC PEPTIDASES" JOURNAL OF ENZYME INHIBITION, NEW YORK, NY, US, vol. 7, no. 2, 1993, pages 77-85, XP001018795 page 78, paragraph 4 page 84, column 1, last line page 82, paragraph 2 ---	13-23
X	SHIMAZAWA R ET AL: "NOVEL SMALL MOLECULE NONPEPTIDE AMINOPEPTIDASE N INHIBITORS WITH A CYCLIC IMIDE SKELETON" JOURNAL OF ENZYME INHIBITION, NEW YORK, NY, US, vol. 14, no. 4, 1999, pages 259-275, XP001018772 abstract ---	13-17, 21-23
X	REINHOLD D ET AL: "INHIBITORS OF DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV INDUCE SECRETION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA1 IN PWM-STIMULATED PBMC AND T CELLS" IMMUNOLOGY, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, GB, vol. 91, no. 3, 1997, pages 354-360, XP000867395 ISSN: 0019-2805 cited in the application page 356, column 1, paragraph RESULTS; figure 1 ---	13-23
X	ANSORGE S ET AL: "MEMBRANE-BOUND PEPTIDASES OF LYMPHOCYTES: FUNCTIONAL IMPLICATIONS" BIOMEDICA BIOCHIMICA ACTA, AKADEMIE VERLAG, BERLIN, DE, vol. 50, no. 4 - 6, 1991, pages 799-807, XP001021975 ISSN: 0232-766X page 805, last paragraph ---	13-23
X	HOFFMANN T ET AL: "DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV (CD 26) AND AMINOPEPTIDASE N (CD 13) CATALYZED HYDROLYSIS OF CYTOKINES AND PEPTIDES WITH N-TERMINAL CYTOKINE SEQUENCES" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 336, no. 1, December 1993 (1993-12), pages 61-64, XP000867397 ISSN: 0014-5793 page 63 -page 64 ---	13-23

-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/15199

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 01 89569 A (ANSORGE SIEGFRIED ; ARNDT MARCO (DE); LENDECKEL UWE (DE); NEUBERT K) 29 November 2001 (2001-11-29) the whole document	13-23
A	----- AUGUSTYNS K ET AL: "THE UNIQUE PROPERTIES OF DIPEPTIDYL-PEPTIDASE IV (DPP IV/CD26) AND THE THERAPEUTIC POTENTIAL OF DPP IV INHIBITORS" CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS BV, BE, vol. 6, no. 4, 1999, pages 311-327, XP000870290 ISSN: 0929-8673 page 314 page 323	13-23
A	----- DE 198 26 972 A (ANSORGE SIEGFRIED ; UNIV HALLE WITTENBERG (DE); UNIV MAGDEBURG TECH) 23 December 1999 (1999-12-23) siehe Ansprüche -----	13-23

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 01/15199

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-12  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
**PCT Rule 39.1(iv) – Method for the treatment of the human or animal body by therapy.**
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
**See supplemental sheet additional matter PCT/ISA/210**
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

## Continuation of Box I.2

The current Claims 13 to 23 concern pharmaceutical preparations each characterized by a desirable characteristic or property, namely the inhibition of DP IV enzyme activity together with the inhibition of APN, APP, ACE or POP (PEP) enzyme activity.

Therefore the claims include all the preparations that display this characteristic or property, whereas the description of the application, within the meaning of PCT Article 5, supports only a limited number of these preparations. In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Nevertheless, the claims also lack the requisite clarity under PCT Article 6 since they attempt to define the compound by the result to be achieved in each case. This lack of clarity is also such that a meaningful search covering the entire range of protection sought is impossible. Therefore the search was directed to the parts of the claims that appeared to be clear, supported and disclosed in the above sense, that is, the parts concerning the combinations specified in the description; see the examples in particular.

It should be noted with respect to dependent Claims 15 to 23 that the use of the term "preferably" is not restrictive.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims

were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national Application No

PCT/EP 01/15199

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0189569	A	29-11-2001	DE	10025464 A1	06-12-2001
			AU	6747501 A	03-12-2001
			WO	0189569 A1	29-11-2001
DE 19826972	A	23-12-1999	DE	19826972 A1	23-12-1999

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/15199

## A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K45/06 A61P37/06 A61P35/00 A61K38/55 //(A61K38/55, 38:55)

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Researchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K A61P

Researchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die researchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	AUGUSTIJNS PATRICK F ET AL: "Transport and metabolism of delta sleep-inducing peptide in cultured human intestinal epithelial cell monolayers." DRUG METABOLISM AND DISPOSITION, Bd. 23, Nr. 12, 1995, Seiten 1372-1378, XP001094376 ISSN: 0090-9556 Seite 1376, Absatz 1 - Absatz 2 --- -/-	13-23

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. Oktober 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

11/10/2002

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Thalmair, M

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

RLT/EP 01/15199

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	<p>STEINMETZER T ET AL: "PEPTIDYL AMMONIUM METHYL KETONES AS SUBSTRATE ANALOG INHIBITORS OF PROLINE-SPECIFIC PEPTIDASES" JOURNAL OF ENZYME INHIBITION, NEW YORK, NY, US, Bd. 7, Nr. 2, 1993, Seiten 77-85, XP001018795 Seite 78, Absatz 4 Seite 84, Spalte 1, letzte Zeile Seite 82, Absatz 2</p> <p>---</p>	13-23
X	<p>SHIMAZAWA R ET AL: "NOVEL SMALL MOLECULE NONPEPTIDE AMINOPEPTIDASE N INHIBITORS WITH A CYCLIC IMIDE SKELETON" JOURNAL OF ENZYME INHIBITION, NEW YORK, NY, US, Bd. 14, Nr. 4, 1999, Seiten 259-275, XP001018772 abstract</p> <p>---</p>	13-17, 21-23
X	<p>REINHOLD D ET AL: "INHIBITORS OF DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV INDUCE SECRETION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA1 IN PWM-STIMULATED PBMC AND T CELLS" IMMUNOLOGY, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, GB, Bd. 91, Nr. 3, 1997, Seiten 354-360, XP000867395 ISSN: 0019-2805 in der Anmeldung erwähnt Seite 356, Spalte 1, Absatz RESULTS; Abbildung 1</p> <p>---</p>	13-23
X	<p>ANSORGE S ET AL: "MEMBRANE-BOUND PEPTIDASES OF LYMPHOCYTES: FUNCTIONAL IMPLICATIONS" BIOMEDICA BIOCHIMICA ACTA, AKADEMIE VERLAG, BERLIN, DE, Bd. 50, Nr. 4 - 6, 1991, Seiten 799-807, XP001021975 ISSN: 0232-766X Seite 805, letzter Absatz</p> <p>---</p>	13-23
X	<p>HOFFMANN T ET AL: "DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV (CD 26) AND AMINOPEPTIDASE N (CD 13) CATALYZED HYDROLYSIS OF CYTOKINES AND PEPTIDES WITH N-TERMINAL CYTOKINE SEQUENCES" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 336, Nr. 1, Dezember 1993 (1993-12), Seiten 61-64, XP000867397 ISSN: 0014-5793 Seite 63 -Seite 64</p> <p>---</p>	13-23
	<p>---</p> <p>-/--</p>	

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/15199

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X,P	WO 01 89569 A (ANSORGE SIEGFRIED ;ARNDT MARCO (DE); LENDECKEL UWE (DE); NEUBERT K) 29. November 2001 (2001-11-29) das ganze Dokument	13-23
A	----- AUGUSTYNS K ET AL: "THE UNIQUE PROPERTIES OF DIPEPTIDYL-PEPTIDASE IV (DPP IV/CD26) AND THE THERAPEUTIC POTENTIAL OF DPP IV INHIBITORS" CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS BV, BE, Bd. 6, Nr. 4, 1999, Seiten 311-327, XP000870290 ISSN: 0929-8673 Seite 314 Seite 323	13-23
A	----- DE 198 26 972 A (ANSORGE SIEGFRIED ;UNIV HALLE WITTENBERG (DE); UNIV MAGDEBURG TECH) 23. Dezember 1999 (1999-12-23) siehe Ansprüche	13-23

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 01/15199

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. 1-12  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
Regel 39.1(iv) PCT - Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers
2. ☒ Ansprüche Nr. -  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr. -  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. -
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## Fortsetzung von Feld I.2

Die geltenden Patentansprüche 13-23 beziehen sich auf pharmazeutische Zubereitungen, jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich die Hemmung der DP IV-Enzymaktivität in Kombination mit der Hemmung der APN-, der APP-, der ACE-, der POP (PEP)-Enzymaktivität.

Die Patentansprüche umfassen daher alle Zubereitungen, die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Zubereitungen liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, die Verbindung über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend die Kombinationen, die in der Beschreibung spezifiziert werden, siehe insbesondere Beispiele.

Bezüglich der abhängigen Ansprüche 15-23 ist anzumerken, dass die Verwendung des Terminus "bevorzugt" bzw. "vorzugsweise" nicht limitierend ist.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

ationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/15199

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung...
WO 0189569	A	29-11-2001	DE	10025464 A1	06-12-2001
			AU	6747501 A	03-12-2001
			WO	0189569 A1	29-11-2001
DE 19826972	A	23-12-1999	DE	19826972 A1	23-12-1999

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie) (Juli 1992)